

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BORDJI Chafika Malak

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

Caractérisation des activités acidifiantes des souches autochtones de *Lactobacillus* : *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus* pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude fromagère.

Président	Dr. RECHIDI - SIDHOUM Nadra	Maître de conférences B	U. Mostaganem
Examineur	Dr.DAHOU Abdelkader El-Amine	Maître de conférences B	U.Mostaganem
Encadreur	Dr. TAHLAITI Hafida	Maitre de conférences B	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences & Techniques de Production Animales (LSTPA), Mostaganem.

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements:

J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail, car sans lui rien n'est possible.

Je remercie vivement, mon encadreur madame TAHLAÏTI Hafida, pour avoir accepté de m'encadrer et d'assurer la direction de ce travail, et pour m'avoir apporté la rigueur scientifique nécessaire à son bon déroulement, qu'elle soit rassurée de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier :

Madame le professeur RECHIDI-SIDHOUM Nadra, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de mon mémoire.

Monsieur DAHOU Abdelkader El-Amine, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.

Mes plus sincères remerciements à Monsieur BOUHADI pour son aide, ses précieux conseils, et ses encouragements.

L'ensemble des enseignants de ma promotion en production et transformation laitière : Mme TAHLAÏTI, Mme RECHIDI SIDHOUM, Mr DAHOU, Mr HOMRANI, Mr BOUCHERF, Melle MEGHOUFEL et Melle ZOUAOUI qui, par leur enseignement, ont contribué à ma formation durant deux ans de master.

Sans oublier l'ingénieur du Laboratoire, Mr. BENHARRAT.

Chafika

Dédicace :

Avec joie, fierté et respect, je dédie ce mémoire :

A mon, très cher père : ma source de courage « Que Dieu aie son âme ».

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

A mon très cher frère Yasser.

A mes très chères sœurs Marwa, Aïcha.

A mes chères amies Nadjet, Hiba, Fouzia, Rania et Bouchra.

Et une spéciale dédicace à mes enseignants depuis mes premières années d'étude.

Enfin je le dédie à tous mes chers amis les étudiants de ma promotion production et transformation laitiers de l'année 2019/2020 chacun par son nom en particulier.

Chafika

Liste des figures

N° de la figure	Titre de la figure	N° de page
Figure 01	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (à gauche) et <i>Lactobacillus casei</i> (à droite), observés au microscope électronique (G x 10 000). (Bouttazzi, 1988) .	21
Figure 02	Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques. (Axelsson, 2004) .	22
Figure 03	Voies homo-fermentaire et hétéro-fermentaire de la dégradation du glucose. (Cocaign-Bousquet, 1996) .	24
Figure 04	Revivification et vérification de la pureté des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	33
Figure 05	Illustration des instruments pour la mesure de l'acidité titrable en °D	34
Figure 06	Evolution du pH en fonction du temps des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	40
Figure 07	Evolution de l'acidité Dornic en fonction du temps des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	41

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre du tableau	N° de page
Tableau 01	Habitat et milieux d'isolement des bactéries lactiques (Eddebi, 1998).	16
Tableau 02	Caractéristiques de quelques espèces de <i>Lactobacillus</i> (Adapté de Bouttazzi, 1988).	21
Tableau 03	Différentes utilisations des bactéries lactiques en alimentation (Dsmazeaud, 1996).	28
Tableau 04	Caractère des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	38
Tableau 05	Représentation de la cinétique d'évolution du pH des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	39
Tableau 06	Représentation de la cinétique d'évolution d'acidité en Dornic (°D) des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> et <i>Lb. acidophilus</i> .	41

Liste des annexes

N° des annexes	Titre des annexes	N° de page
Annexe 01	Composition des milieux de culture: Bouillon MRS	52
	Gélose MRS	53
Annexe 02	Coloration Gram	54
Annexe 03	Détermination de l'acidité en degré Dornic	55

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADP : Adénosine Triphosphate.

ATP : l'Adénosine Triphosphate.

Bif : *Bifidobactérium*.

BL : Bactéries Lactiques.

Cb : *Carnobactérium*.

°D : degré Dornic.

G-C : Guanine-Cytosine.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

Lb : *Lactobacillus*.

Lc : *Lactococcus*.

Leu : *Leuconostoc*.

LSTPA : Laboratoire de Recherche en Sciences Techniques et Production Animale.

Système de PTS : système Phosphotransférase.

UFC : unité formant colonie.

Voies EMP : Voie d'Embden-Meyerhof-Parnas.

% : pour Cent.

Liste des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction..... 11

Partie Bibliographique

1. Définition des bactéries lactiques.....	13
2. Généralités sur les bactéries lactiques.....	13
3. Classification des bactéries (Taxonomie).....	14
3.1. Classification classique (Taxonomie classique).....	14
3.2. Taxonomie moderne.....	14
4. Habitat des bactéries lactiques.....	15
5. Caractéristiques des bactéries lactiques.....	17
5.1. Principales caractéristiques.....	17
5.2. Caractères morphologiques.....	17
5.3. Caractères biochimiques et physiologiques.....	18
6. Les différents genres des bactéries lactiques.....	18
6.1. Les coques.....	18
6.2. Les bacilles.....	18
7. Genre <i>Lactobacillus</i>	19
7.1. Groupe1 : (Lactobacilles homo-fermentaires obligatoires).....	19
7.2. Groupe2 : (groupe hétérogène des lactobacilles homo-fermentaires facultatifs).....	19
7.3. Groupe3 : (groupe des Lactobacilles hétéro-fermentaires obligatoires).....	19
8. Caractères culturaux et exigences nutritionnelles.....	20
9. Principales propriétés métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques.....	21
9.1. Métabolisme du lactose en acide lactique.....	23

9.1.1. Voie homo fermentaire ou EMP.....	23
9.1.2. Voie hétéro fermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	23
10. Biodiversité des bactéries lactiques dans les fromages.....	24
11. Processus de fabrication et d'affinage du fromage.....	25
12. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques.....	25
12.1. Pouvoir acidifiant.....	26
13. Les facteurs agissant sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques.....	27
13.1. Influence des substrats carbonés.....	27
13.2. Température.....	27
13.3. Le pH.....	27
13.4. L'oxygène.....	27
14. Principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation...	28
14.1. Utilisation des bactéries lactiques dans la fabrication des produits laitiers.....	29

Partie Expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

1. Lieu de l'étude.....	31
2. Objectif du travail.....	31
3. Souches utilisées.....	31
4. Milieux de cultures utilisés..... ;	31
5. Revivification des souches.....	31
6. Purification des souches lactiques.....	32
7. Vérification de la pureté des souches de bactéries utilisées.....	32
• Examen microscopique.....	32
• Examen macroscopique	32
• Test de catalase.....	32
8. Conservation des souches.....	33
• Conservation à courte durée.....	33
• Conservation à longue durée.....	34
9. Activité acidifiante des souches.....	34
• Cinétique d'acidification dans le lait.....	34
• Méthode de mesure du pH.....	34
• Méthode de mesure de l'acidité Dornic.....	34

Chapitre II: Résultat et discussion

1) Vérification de la pureté des souches.....	37
1.1. Caractérisation macroscopique.....	37
1.2. Caractérisation microscopique.....	37
2) L'activité acidifiante.....	39
a. Evolution du pH.....	39
b. Evolution de l'acidité titrable.....	40
3) Discussion générale.....	42
 Conclusion.....	 43

Références bibliographiques

Annexes

Résumé, ملخص, abstract.

Introduction :

En Algérie, une quantité considérable de lait récoltée sert à la fabrication de produits laitiers, comme les fromages, les yaourts et laits fermentés, mais une meilleure connaissance des bactéries lactiques permettrait de créer ces produits.

C'est bien connu, les Algériens en général, comme tous d'ailleurs aux quatre coins du monde, sont de grands consommateurs des produits laitiers, mais peu d'entre eux ont conscience de la richesse que peut apporter ces produits laitiers fermentés et dérivés ; ce sont des aliments très riches en principaux composants (glucides, protéines et lipides) essentiels en alimentation humaine.

Les bactéries lactiques qui sont au cœur de ce résultat, sont largement impliquées dans la fabrication de nombreux produits laitiers fermentés, tel que le yaourt, le fromage, le beurre et le kéfir.

La technologie laitière utilisée dans la fabrication du produit repose essentiellement sur la fermentation des bactéries lactiques en particulier les lactobacilles ; ces bactéries sont déjà reconnues pour la production des acides organiques qui abaissent le pH des aliments, ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production du CO₂ par les lactobacilles réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures **(Desmazeaud, 1992)**.

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'activité acidifiante de 03 souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*), afin de sélectionner les souches les plus acidifiantes en vue d'améliorer la production fromagère.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire des sciences et techniques de production animales (LSTPA), de Hassi Mamèche, affilié à l'Université de Mostaganem.

Ce mémoire renferme deux parties, une synthèse bibliographique consacrée à la présentation des bactéries lactiques avec le comportement des lactobacilles dans la production fromagère, et une autre partie pratique qui détermine l'aptitude acidifiante des souches de lactobacilles ainsi que la discussion des résultats obtenus lors de ce travail et enfin une conclusion générale qui résumera les résultats obtenus.

Partie Bibliographique

1) Définition des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes hétérogènes, selon leur morphologie, leur structure, leur physiologie et leur nutrition. Ce sont des cellules vivantes, procaryotes et chimio-organotrophes. **(De Roissart, 1986).**

2) Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques (BL) ont été longtemps considérées comme importantes pour la santé humaine. En **1905 Metchnikoff** a postulé que les bactéries impliquées dans la fermentation du yaourt jouent un rôle important dans le maintien de la santé humaine **(Mills, 2004).**

Les BL sont trouvées dans diverses niches écologiques, tel que le lait, ainsi que certaines nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux **(Mathara, 2004).**

Les bactéries lactiques ont été décrites la première fois en tant qu'organismes présents dans le lait, dues au lait aigre qui résulte de la production d'acide lactique. Elles forment un groupe de bactéries relativement divers, mais reliées entre elles par un certain nombre de fonctions métaboliques et physiologiques typiques **(Yang, 2000).** D'une façon générale le groupe se compose de bactéries sous forme, de coques ou de bâtonnets à Gram positifs, non sporulant, anaérobies facultatifs, généralement immobiles, catalase négative, oxydase négative et nitrate réductase négative et produisent l'acide lactique comme produit final principal pendant la fermentation **(Kandler, 1983).** Les BL sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter, homo fermentaires ou hétéro fermentaires.

Les bactéries lactiques ont été utilisées pendant des siècles pour la fermentation des aliments. Considéré comme inoffensif pour l'Homme, leur utilisation s'est largement répandue dans l'industrie alimentaire. En effet, le développement des nouvelles technologies de biologie cellulaire ouvre des opportunités pour l'utilisation de ces bactéries comme agents bio-thérapeutiques. Ces espèces produisent des protéines hétérogènes telles que les enzymes (lipase, lactase, estérase), des médiateurs chimiques (hormones et interleukines) et des molécules capables de stimuler des réponses immunitaires locales **(Mofred, 2007).** Elles permettent, par leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et de leur conférer une saveur et une texture différente **(Badis, 2005).** Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose etc.) en acide lactique, elles ne produisent pas de pseudo-catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotolérant en raison de l'absence de chaîne respiratoire **(Makhloufi, 2011).**

Les bactéries lactiques utilisées dans les fermentations laitières peuvent être divisées en deux groupes sur la base de leur croissance optimale. Les bactéries mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20° C et 30°C et les thermophiles entre 30°C et 45°C. Alors que la majorité de 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, 2005**).

Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie appartiennent principalement à trois genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ces trois genres microbiens se différencient particulièrement par leur température optimale de croissance et leur propriété acidifiante (**Dridier et Préost, 2009**).

3) Classification des bactéries (Taxonomie) :

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres et leur classification a été l'objet d'intérêt de plusieurs chercheurs.

3.1. Classification classique (Taxonomie classique) :

C'est une classification basée sur les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques (mode de fermentation du glucose et l'acide lactique produit, température de croissance). (**Orla Jensen, 1919, Tahlaiti h, 2019**).

Ce sont soit des coques (*Streptococcus*) mais aussi (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*), soit des bacilles (*Lactobacillus*) qui se distinguent en plus par leur type de fermentation : hétéro lactique ou homolactique. A ces genres ; a été ajouté récemment le genre *Bifidobacterium*. (**Kandler et Weiss, 1986**).

3.2. Taxonomie moderne :

La taxonomie bactérienne moderne elle s'appuie principalement sur les techniques d'électrophorèse des protéines et des études des acides nucléiques, la définition de pourcentage GC de l'ADN, ce qui permet de définir une souche bactérienne du point de vue de la taxonomie moléculaire.

Les bactéries lactiques sont un groupe phylogénétique divers avec un GC de 50% (guanine et cytosine) en leur ADN. Le pourcentage G+C (GC%) de leur ADN donne une composition assez proche pour le genre *Lactococcus* (34,46%), *Leuconostoc* (36,43%), *Pediococcus* (34,42%) et *Bifidobacterium* (67%) alors que le genre *Lactobacillus* est caractérisée par une grande hétérogénéité (32,53 %) (**Novel, 1993**). Excepté les bifidobactéries, tous les genres mentionnés ci-dessus appartiennent au phylum avec un contenu en G/C (50%) bas (**Schleifer et Ludwig, 1995**).

4) Habitat des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très répandues dans la nature grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, elles peuvent coloniser des milieux très différents riches en principaux nutriments à savoir (le lait, les produits laitiers, les viandes, les poissons, les végétaux, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif). **(Desmazeaud, 1992)**.

- Les espèces du genre *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* se rencontrent surtout chez les hommes, animaux, oiseaux ou dans la peau des animaux et des matières fécales. **(Hermier, 1992 ; Deroissart et Luquet, 1994)**.
- Les espèces du genre *Pediococcus* se rencontrent sur les plantes, les végétaux, les poissons, les viandes et les céréales. **(Lenoir et Hermier, 1992)**.
- Par ailleurs, les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents en particulier dans le lait et les fromages (*Lb. casei sub sp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. acidophilus* et *Lb. brevis*) ; dans les laits fermentés (*Lb. kéfir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*) ; dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîche (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus* et *Lb. buchneri*). **(Desmazeaud, 1996)**.
- Pour les espèces du genre *Bifidobacterium* elles ont été découvertes exclusivement chez l'homme et les animaux.

Tableau (01) : L'habitat et les milieux d'isolement des bactéries lactiques (Eddebi, 1998).

Espèces	Habitat ou milieux d'isolement
Lactobacillus <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei subsp. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. bravarius</i> <i>Lb. sanfransisco</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. bifementans</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. fermentum</i>	Yaourt, fromage, tractus intestinal Lait Végétaux, yaourt, fromage, produit carné, bouche Lait, fromage, végétaux, produit carné Ensilage, végétaux, lait, tractus intestinal Lait fermenté, kéfir Végétaux fermentés Produits de panification Lait, fromage Végétaux et produit carnés Fromage Produit carnés, tractus intestinal Végétaux, fromage, bouche.
Streptococcus <i>St. Thermophilus</i>	Lait chauffé 45-50°C, lait pasteurisé, yaourt et levains artisanaux.
Leuconostoc <i>L. oenos</i>	Lait, produit laitiers, fruits, betteraves, végétaux en fermentation (choucroute), solutions visqueuses de sucres. Vin (absent dans le lait).
Pediococcus <i>Pc. pentosaceus</i> <i>Pc. acidophilus</i> <i>Pc. Halophilus</i>	Végétaux, boisson (bière, cidre et vin) Végétaux en décomposition, produit laitiers Matières végétales, lait Lait, produits laitiers, saucisson, anchois salés.
Lactococcus <i>Lc. lactis subsp. lactis</i> <i>Lc. lactis subsp. diacetylactis</i> <i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> <i>Lc. raffinolactis</i> <i>Lc. graviae</i> <i>Lc. plantarum</i> <i>Lc. hordiniae</i>	Lait crus, lait fermenté, végétaux et flore minoritaire du rumen. Végétaux ; lait Uniquement lait Lait caillé Lait de mammites Poids congelés Cicadelle nommée hordiniae.

5) Caractéristiques des bactéries lactiques :

5.1. Principales caractéristiques :

A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont à Gram positif. Elles sont asporulées, immobiles, anaérobies mais aérotolérantes, ne possèdent ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase ; elles sont aussi catalase négative (certaines souches possèdent une pseudo-catalase). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels et les acides gras. **(Dellaglio, 1994 ; Gonzalez, 2000 ; Holzapfel, 2001).**

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui repose dans sa grande partie sur l'utilisation des glucides, car en les utilisant elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), ou en plus de l'acide lactique elles produisent de l'acide acétique (bactéries hétéro lactiques facultatives) ou encore de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (bactéries hétéro lactiques strictes). **(Vandamme, 1996).** Certaines espèces peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique. **(Deroissart et Luquet, 1994, Tahlaiti h ; 2019).**

5.2. 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 milieux solides. 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 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, 1994)**. Elles sont toutes à Gram positif et généralement immobiles. Leur mode d'association est très hétérogène (cellules isolées, paires, tétrades, amas irréguliers, longues ou courtes chainettes) mais spécifique à chaque genre bactérien.

5.3. 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 homo fermentaires, car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique.

Les hétéro fermentaires produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (généralement l'acétate et l'éthanol).

Les bactéries lactiques sont dépourvues de cytochrome-oxydase et généralement de nitrate réductase. Ces bactéries ne possèdent pas de voies fonctionnelles pour la synthèse de l'hème (**Duwat, 2001 ; Miyoshi, 2003**) ; c'est pour cette raison qu'elles sont habituellement considérées comme déficientes pour l'activité catalase héminique dont le substrat est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Par contre, si de l'hémine est incluse dans le milieu qui est incubé en aérobiose, certaines bactéries lactiques (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ou *Pediococcus acidilactici*) développent une activité catalasique. Par ailleurs, certaines des bactéries lactiques sont pourvues d'une pseudo-catalase à manganèse appelée aussi superoxyde dismutase (SODs) dont les substrats sont les radicaux libres O₂. (**Desmazeaud, 1983**).

En outre, 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, 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 et les acides gras.

6) Les différents genres des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance d'ailleurs différentes. Selon la morphologie, ce groupe peut être divisé en deux formes.

6.1. Les coques :

C'est le cas de *Streptococcus*, mais aussi de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

6.2. Les bacilles :

Cette forme est représentée par le genre *Lactobacillus*. Elles se distinguent en plus par leur type fermentaire : homolactique ou hétéro lactique. (**Kandler et Weiss, 1986**).

7) Genre Lactobacilles :

Ce genre appartient à la famille des *Lactobacillaceae* de forme bâtonnet ou coccobacilles, souvent groupés en chaînes, présentent une forte exigence en facteurs de croissance, immobiles ou mobiles, anaérobies facultatifs, micro-aérophiles, ne réduisent pas les citrates, n'hydrolysent pas la gélatine, et acidophiles. (Garvie, 1982).

Originellement elles ont été classées en 03 groupes par (Orla- Jensen, 1919)

- *Thermobacterium*: homo-fermentaire et thermophile.
- *Streptobacterium*: homo-fermentaire et mésophile.
- *Bétabactrium*: hétéro-fermentaire, soit mésophile soit thermophile.

7.1. Groupe1 : (Lactobacilles homo-fermentaires obligatoires):

Ce sont des cellules longues droites souvent en palissades, incapables de fermenter les pentoses et le gluconate (Bottazzi, 1988), fermentent les hexoses et en produisent du lactate jusqu'à 85% à partir du glucose (Novel, 1993).

Les espèces les plus connues sont :

- *Lb. lactis* ;
- *Lb. acidophilus* ;
- *Lb. helveticus* ;

Et peuvent produire jusqu'à 18g/l d'acide lactique.

7.2. Groupe2 : (groupe hétérogène des lactobacilles homo-fermentaires facultatifs):

Se présentent comme étant des cellules courtes, souvent arrangées en filaments (Boutazzi, 1988), fermentent les hexoses par la voie homo-fermentaires (parfois hétéro-fermentaire) et fermentent les pentoses et le gluconate par la voie hétéro-fermentaire et produisent peu d'acides lactiques 3 à 13g/l. (Kandler et Weiss, 1986).

Les espèces les plus connues sont :

- *Lactobacillus plantarum* ;
- *Lb. casei* ;
- *Lb. rhamonosus*.

7.3. Groupe3 : (groupe des Lactobacilles hétéro-fermentaires obligatoires):

Ce groupe renferme des espèces très diverses, les cellules bactériennes sont courtes droites et séparées (Boutazzi, 1988), fermentent les hexoses en produisant de lactate, de l'acide acétique, de l'éthanol, du CO₂ et fermentent les pentoses en produisant de lactate et de l'acétate. (Kandler et Weiss, 1986).

Leur production est faible ; 5 g/l de lactate (Novel, 1993).

Les espèces les plus connues sont:

- *Lb. brevis* ;
- *Lb. reuteri* ;
- *Lb. fermentum* ;

8) Caractères cultureux et exigences nutritionnelles:

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 45°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (**Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004**). De plus, les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête, lorsque le pH avoisine 3,5. Quant au milieu le plus adapté à leur culture c'est celui de Man, Rogosa et Sharpe (MRS), où les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (**De Vos, 2009**).

Par ailleurs, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses, à savoir les exigences en vitamine telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine (B12) peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *Lb. helveticus sp jugurti*, lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique.

A cela s'ajoute les exigences en bases azotées et en cations, notamment les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} ou Fe^{2+} qui sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles le manganèse et le magnésium et interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles. (**De Man, 1960 ; De Vos, 2009**).

Tableau (02) : Les caractéristiques de quelques espèces de *Lactobacillus* (adapté de **Bouttazzi, 1988**).

Espèces	Fermentation du lactose	Croissance		
		A 15°C	A 45°C	
<i>Lb. helveticus</i>	Homo-fermentaire	-	+	Thermophile
<i>Lb. delbruekii subsp lactis</i>		-	+	
<i>Lb. acidophilus</i>		-	+	
<i>Lb. casei</i>	Hétéro-fermentaire	+	-	Mésophiles
<i>Lb. plantarum</i>		+	-	
<i>Lb. kefir</i>		+	-	
<i>Lb. brevis</i>		+	-	
<i>Lb. fermentum</i>		-	+	Thermophile

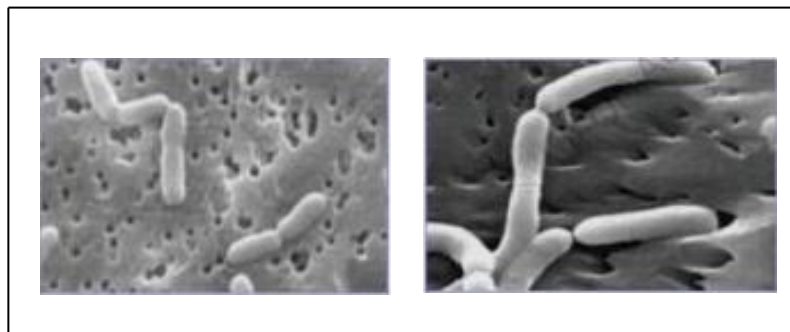


Figure (01) : *Lactobacillus acidophilus* (à gauche) et *Lactobacillus casei* (à droite), observés au microscope électronique ($G \times 10\ 000$). (**Bouttazzi, 1988**).

9) Principales propriétés métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques :

Les bactéries lactiques utilisées comme ferment dans la fabrication fromagère ont pour principale fonction de produire de l'acide lactique et dans certains cas de produire des composés d'arôme ou des précurseurs. Les principales activités métaboliques impliquées sont la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse (**Figure 02**).

Les autres facteurs responsables de ces activités dans le fromage sont les levains secondaires, des flores et des enzymes endogènes du lait et du coagulant. De plus, l'autolyse de certaines bactéries lactiques conduit à la libération de leurs enzymes intracellulaires dans la matrice fromagère (**Fitzsimons, 1999**), ce qui peut ainsi accélérer l'affinage et contribuer au développement de la flaveur des fromages. (**Collins, 2003**).

Les paragraphes suivants porteront principalement sur les voies de dégradation du lactose en acide lactique, des protéines et peptides issus de lait en acides aminés en passant par leur catabolisme aboutissant aux composés d'arômes et leur activité protéolytique qui contribue énormément dans ce phénomène d'intérêt.

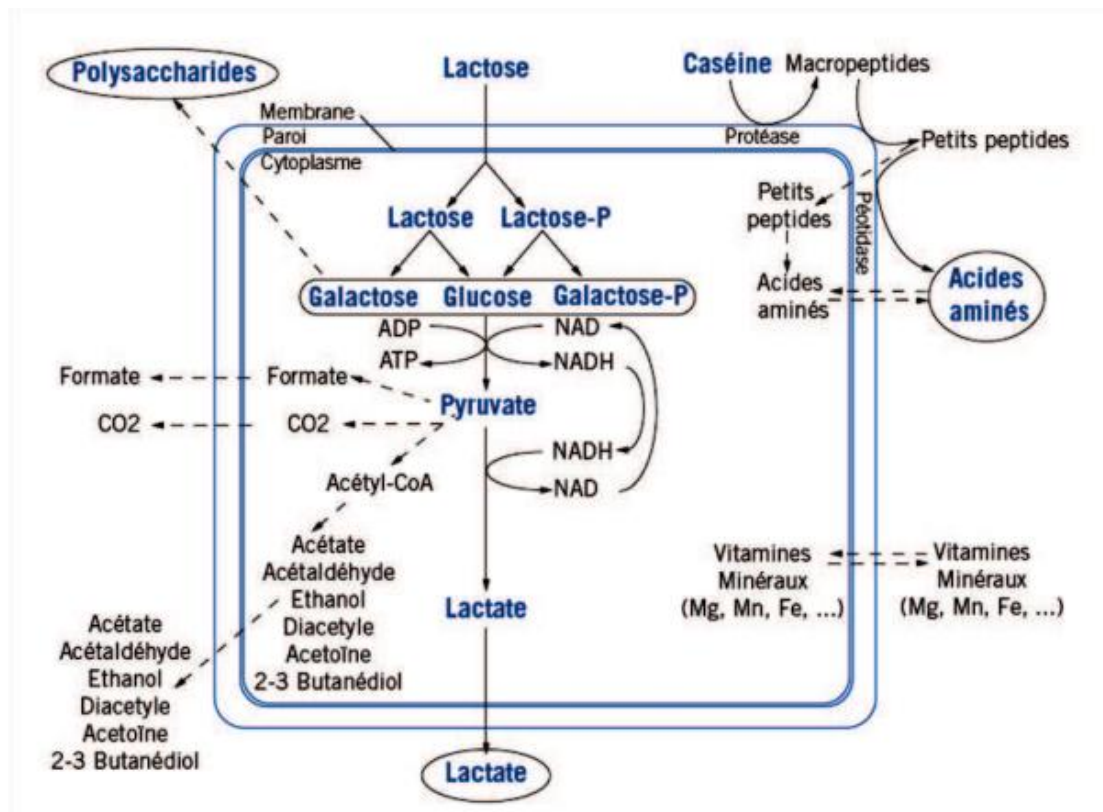


Figure (02) : Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologiques. (Axelsson, 2004).

9.1. Métabolisme du lactose en acide lactique :

Dans le lait, le sucre principal est le lactose. C'est un disaccharide, composé de glucose et de galactose, dont la dégradation conduit à la production d'énergie intracellulaire et d'acide lactique.

L'évolution des concentrations en lactose et en acide lactique est variable suivant le type de pâte et la flore microbienne utilisée. Dans le cas des fromages de type Camembert, la quantité de lactose résiduel diminue rapidement en surface au cours des premiers jours d'affinage pour disparaître au bout du 10^{ème} jour, alors qu'au cœur, sa dégradation est plus lente et ne s'achève que vers le 30^{ème} jour de maturation (**Choisy, 1997, Tahlaïti h, 2019**).

La dégradation du lactose en acide lactique par la flore lactique comporte plusieurs étapes :

Le transport du lactose à travers la membrane cellulaire ;
Le catabolisme du lactose selon une voie homo fermentaire (donnant lieu à l'acide lactique comme unique produit de dégradation du glucose via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) (EMP) Ou hétéro fermentaire (produisant des quantités équimolaires de lactate, éthanol et CO₂, à partir du glucose par la voie des pentoses phosphates) ;

Et enfin, la formation et l'expulsion extracellulaire de l'acide lactique (**Figure 03**).

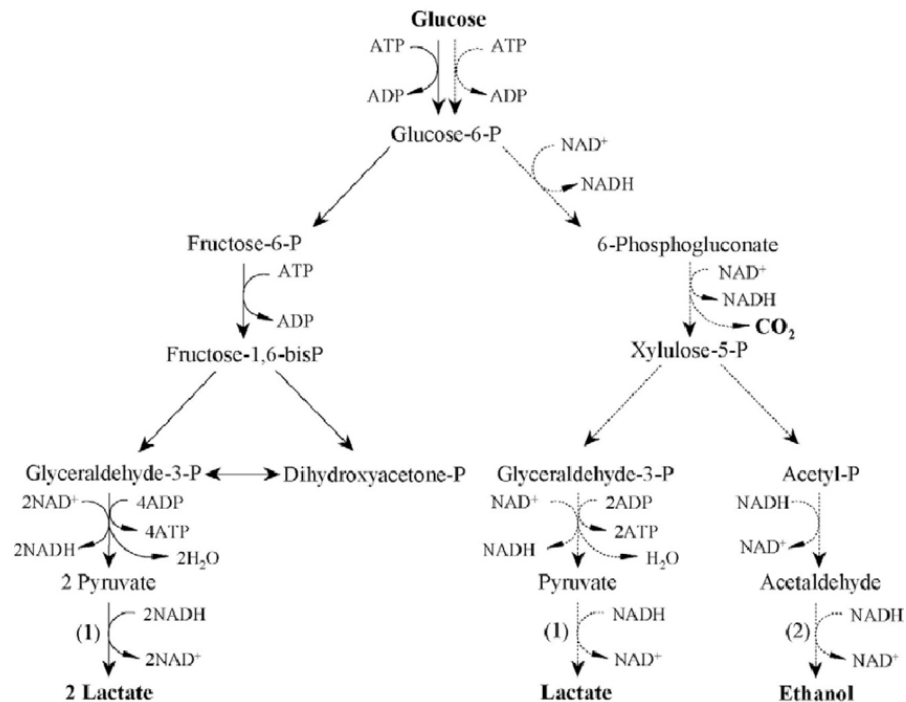
- Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homo fermentaires (Embden-meyerhof-parnas, EMP) et hétéro fermentaire (voie des pentoses-phosphate) (**Atlan, 2008**).

9.1.1. Voie homo-fermentaire ou EMP:

Les bactéries lactiques homo-fermentaires comprennent les espèces de Lactocoques, Pediocoques, 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. Le fructose-1,6-bisphosphate aldolase est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (**Thompson et Gentry- Weeks, 1994**).

9.1.2. Voie hétéro-fermentaire 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 hétéro-fermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les Leuconostoc et certains Lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus le système de PTS (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).



Homo-fermentaire

Hétéro-fermentaire

Figure (03) : Voies homo-fermentaire et hétéro-fermentaire de la dégradation du glucose. (Cocaign-Bousquet, 1996).

10) 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 UFC/g de fromage au cours de l'affinage (Richard, 1984 ; Desmasures, 1995), avec une prédominance de l'espèce *Lactococcus lactis*.

Au niveau intra spécifique, Corroler (1999) a mis en évidence une appartenance unique à la sous-espèce *Lc. lactis ssp. lactis* au plan phénotypique, alors que les mêmes souches se différenciaient en deux sous-espèces *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 UFC/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, 1997**).

L'évolution de la flore lactique du Venaco, pâte molle à croute 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 UFC/g après 2 jours dans les produits dérivés. Ce genre représente le principal agent acidifiant du Venaco. Le lactobacille hétéro-fermentaire facultatif, 10 fois plus nombreux dans les laits de chèvre ($2 \cdot 10^4$ germes/ml) que dans ceux de brebis (10^3 germes/ml), 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 UFC/g après 15 jours. Les Leuconostocs et Enterocoques, initialement présents dans le lait de chèvre ou de brebis, sont aussi retrouvés au cours de l'affinage.

11) Processus de fabrication et d'affinage du fromage :

Bien que les étapes de fabrication de fromage puissent varier d'un type de fromage à un autre, les étapes fondamentales demeurent l'acidification, la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage. (**Accolas, 1982 ; Mietton, 1994**).

La première étape de fabrication de fromage est la plus importante (**Accolas, 1982 ; Mietton, 1994**), en effet, le lait se transforme en un gel qui occupe tout le volume initial suite à son acidification dû à la fermentation lactique et par l'addition de présure, enzyme coagulante. Ces actions modifient la structure des caséines du lait aboutissant à la formation d'un réseau (coagulum).

Suite à la coagulation, à l'égouttage et au salage, intervient le processus de maturation, donc l'affinage, entre en jeu. Le mûrissage de fromage est un processus biochimique très complexe dans lequel des enzymes microbiennes jouent un rôle majeur, il permet de donner diverses caractéristiques organoleptiques à chacune des variétés de fromage (**Kang, 1998**). Cette étape est essentiellement enzymatique et implique, l'un ou l'autre ou une combinaison de divers agents de maturation. Les protéases microbiennes, la présure, les enzymes endogènes du lait, les enzymes provenant des bactéries lactiques primaires relâchées après l'autolyse des cellules, les enzymes des organismes lactiques secondaires (bactéries, levures et champignons), les enzymes provenant de certains organismes ayant survécu à la pasteurisation ou introduits involontairement durant le procédé de fabrication (**Mietton, 1994; Kang, 1998**).

12) Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :

Les progrès effectués dans la connaissance des bactéries lactiques ont mis en évidence une grande diversité d'espèces et de souches, ainsi qu'un très large

éventail de propriétés, allant bien au-delà du potentiel acidifiant. Ainsi, deux souches d'une même espèce peuvent manifester des propriétés extrêmement différentes. A cela, s'ajoutent d'autres facteurs plus spécifiques du contexte industriel. C'est le cas des associations de plusieurs souches, réalisées afin de constituer des ferments susceptibles de générer l'ensemble des propriétés requises pour l'élaboration d'un produit, ou des interactions de ces souches avec différentes matrices alimentaires qui correspondent à autant de milieux de culture particuliers. Tout ceci complique fortement la mise en œuvre et la maîtrise des bactéries lactiques dans les aliments. **(Corrieu et Luquet, 2008)**.

12.1. Pouvoir acidifiant :

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques dans la fabrication des produits fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production de l'acide lactique résultant de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne. **(Visessanguan, 2006)**.

Cette propriété d'acidification a pour conséquence, la coagulation des protéines insolubles (caséines du lait) avec une chute du pH et l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes et de la flore d'altération. Du point de vue technologique, l'acidification participe aux propriétés rhéologiques (texture et saveur) du produit final.

L'activité acidifiante des ferments dépend de la nature et de l'équilibre entre les différentes souches présentes, en particulier, la présence de certaines espèces ou mélanges d'espèces différentes va permettre d'obtenir l'activité voulue.

Cependant, il est important de souligner qu'il existe une forte variabilité de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, y compris au sein d'une même espèce **(Corrieu et Luquet, 2008)**.

Les conséquences d'acidification, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par **(Béal, 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, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Monnet, 2008**).

13) Les facteurs agissant sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques :

13.1. Influence des substrats carbonés :

Les concentrations élevées en substrat carbonés permettent d'accroître la vitesse de croissance des bactéries lactiques, mais cela jusqu'à un seuil maximal au-delà duquel la vitesse reste constante et devient indépendante de la concentration, comme le décrit la relation de **Mickaelis-Menten**. (**Desmazeau et de Roissart, 1994**).

13.2. Température :

Les bactéries lactiques ont une température optimale de croissance comprise entre 10°C et 45°C, mais certaines peuvent croître à 0°C (**Mataragasa, 2003 ; Chaillou, 2005**). Les rendements en biomasse et en acide lactique sont à leurs niveaux maximum lorsque les fermentations sont réalisées aux températures optimales de croissance. La température peut aussi influencer l'isomérisation de l'acide lactique formé (**Lino, 2003**).

13.3. Le pH :

La majorité des bactéries lactiques se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. La croissance bactérienne est inhibée lorsque le pH du milieu devient acide (**Torrino, 2001 ; Liu, 2003**). Le pH influence sur la croissance des bactéries lactiques mais il peut aussi agir sur la voie de fermentation des sucres (homo ou hétéro fermentaire), le rendement de la fermentation, et l'isomérisation de l'acide lactique formé (**Rhee et Pack, 1980**).

13.4. L'oxygène :

Les bactéries lactiques ont une meilleure croissance en anaérobiose mais elles peuvent être aérotolérantes. Certaines souches peuvent croître en présence de 20 % d'oxygène, à 8 °C, mais ont des taux de croissance supérieurs en anaérobiose et en présence de faibles quantités de dioxyde de carbone (10 % de CO₂, 90 % de N₂) (**Amanatidou, 2001**).

Les bactéries lactiques homo fermentaires en anaérobiose, produisent moins de lactate, plus d'acétate, et moins d'éthanol et de formate en présence d'oxygène. Cela peut être expliqué par l'augmentation de l'activité pyruvate oxydase, ou l'extrême sensibilité du pyruvate-formate lyase à l'oxygène (**Condon, 1987**).

14) Principales utilisations des bactéries lactiques en alimentation :

C'est à partir des années 1900, que le développement des industries de transformation a conduit à la production industrielle des bactéries lactiques adaptées aux différents produits.

Ces bactéries sont des espèces déterminées et leur activité globale caractérise le ferment, l'acidification, la protéolyse, la formation d'arôme, l'obtention d'une texture...etc. (**Tableau 03**). Par ailleurs, ces souches recombinaées naturellement sont déjà utilisées (**Sanders, 1986**) et celles modifiées par génie génétique sont actuellement en plein essor.

Tableau 03 : Différentes utilisations des bactéries lactiques en alimentation (**Dsmazeaud, 1996**).

Produits laitiers : fromages, yaourts, laits, kéfirs.
<i>Lactococcus lactis subsp, lactis et blovar diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides, Leuc, lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus, Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus et subsp. lactis</i> <i>Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. kefir, Lb. hilgradii</i> <i>Bifidobactérium bifibum, Bif. langum.</i>
Fermentation des végétaux: «pickles», choucroute, «miso», «gari», olives
<i>Lactobacillus plantarum, Lb. bervis, Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediciccus pentosaceus, Pc. damnosus</i> Pains spéciaux aux levains. <i>Lactobacillus plantarum. Lb. brévis, Lb. fermentum, Lb. sanfrancisco</i>
Fermentation des produits carnés
<i>Carnobactérium divergens, Cb. piscicola</i> <i>Lactobacillus sake, Lb. curvatus.</i>
Fermentation des produits de la pêche.
<i>Pediococcus halphilus, lactobacillus buchenri, Lb. brevis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Boissons: vin, bière, cidres
<i>Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni), Lactobacillus delbrueckii</i>

14.1. Utilisation des bactéries lactiques dans la fabrication des produits laitiers :

Les ferments lactiques commerciaux sont généralement, cultivés sous forme de levains servant à ensemencer les cuves de fabrication, une des techniques récentes : les ferments concentrés congelés ou lyophilisés permettent en ensemencement direct des cuves. **(Gilliland, 1985).**

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication des fromages, des yaourts fermentés et du kéfir.

Selon les types de fromage, la coagulation du lait est obtenue par les actions conjuguées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques Lactocoques essentiellement et ou *Leuconostoc* pour les fromages à pâte moelle ou à pâte pressée, streptocoques thermophiles et *Lactobacillus* thermophiles pour les fromages à pâte cuite, comme on peut utiliser ces bactéries associées à des levures (dans le cas du kéfir) ou à des *Bifidobactérium*.

Le rôle principal de ces bactéries est l'abaissement du pH du lait ou des caillés, selon les cinétiques spécifiques à chaque fabrication.

En plus, du rôle fondamental d'acidification responsable de la formation du gel, puis du caillé, les bactéries lactiques interviennent dans la production des composés d'arômes ou de leurs précurseurs.

Dans les fromages affinés, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale, car elle complète l'action de la présure et celle du plasmide (protéase naturelle du lait). **(Desmazeaud, 1996).**

Certaines souches de *Lactobacillus lactis subsp. lactis* et de *Lactobacillus* produisent des bactériocines actives contre des bactéries contaminants et parfois contre des souches pathogènes.

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1) Lieu de l'étude :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire des sciences et techniques de production animales (LSTPA), au niveau de l'exploitation agricole de Hassi Mamèche, affilié à l'Université de Mostaganem.

2) Objectif du travail :

L'objectif du travail est d'étudier l'activité acidifiante des 03 souches de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*), afin de sélectionner les souches les plus acidifiantes en vue de les utiliser en mixture dans la transformation fromagère adaptée de nos laits.

3) Souches utilisées:

Trois souches de la collection des souches du Laboratoire sont utilisées dans cette étude ;

- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus acidophilus*

4) Milieux de cultures utilisés :

Les milieux de culture utilisés dans cette étude :

- Le milieu MRS en bouillon et solide (**Annexe 01**) a été utilisé pour la revivification, la conservation et la préparation des différentes souches isolées ;
- Le lait a été aussi utilisé comme un milieu d'enrichissement et de conservation.

5) Revivification des souches :

Les souches lactiques étaient conservées dans du bouillon MRS avec glycérol à – 20°C dans des tubes.

Leur revivification consiste à prendre un volume de 1 ml des cultures de souches de bactéries lactiques dans des tubes à essai stériles contenant 5 ml de bouillon MRS déjà préparé.

Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 48 heures, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

6) Purification des souches lactiques :

Cette étape se fait après la revivification et consiste à réaliser un ensemencement par stries à partir du bouillon d'enrichissement sur gélose MRS ; L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 heures.

Cette opération est répétée au minimum trois fois pour chaque souche, afin d'avoir des cultures fraîches de bactéries lactiques.

7) Vérification de la pureté des souches de bactéries utilisées :

Nos souches sont déjà connues : *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*, on réalise la vérification de leur pureté, avant toute utilisation. Après le dernier repiquage et au terme de l'incubation, la pureté est vérifiée en réalisant quelques tests rapides et simples :

- Examen Macroscopique :

Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des souches sur gélose et bouillon MRS, pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies ainsi, l'aspect du trouble dans le bouillon.

- Examen Microscopique (Coloration Gram) :

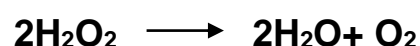
Il permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association après préparation d'un frottis coloré selon les étapes décrites de la coloration Gram. **(Annexe 02)**

Les cellules que retiennent le violet de gentiane après traitement par le lugol et l'alcool sont dites Gram (+) et celles qui prennent la coloration rose de la fuchsine sont dites à Gram (-).

- Les bactéries lactiques sont à Gram positifs.

- Test de Catalase :

La catalase est une enzyme respiratoire produite par les bactéries aérobies strictes ou facultatives. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) selon la réaction :



Pour mettre en évidence la production de cette enzyme, on prélève une colonie de souche de Lactobacille, qu'on étale avec l'anse sur une lame et on ajoute une goutte d'eau oxygénée à 10%.

La présence de catalase se manifeste par une effervescence qui indique une formation de bulles d'air, dues à la dégradation de l'eau oxygénée.

- Les bactéries lactiques sont à catalase négatives.

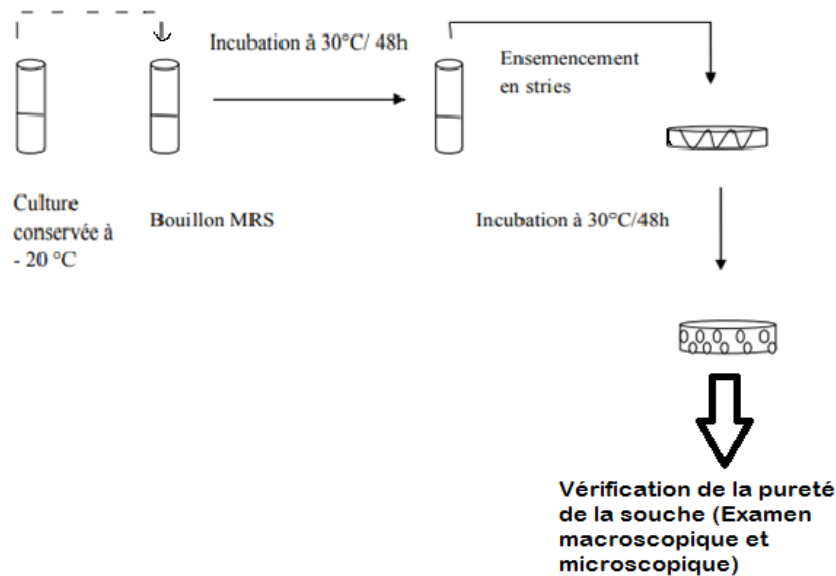


Figure (04) : Revivification et vérification de la pureté des souches de *Lb plantarum*, *Lb casei* et *Lb acidophilus*.

8) Conservation des souches :

Deux types de conservations sont réalisés : Une à courte et l'autre à longue durée ;

- **Conservation de courte durée :** Les souches pures, ont été ensemencées dans des tubes inclinés de bouillon MRS, à pH 6,2. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, les tubes ont été placés à 4°C au réfrigérateur et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.
- **Conservation de longue durée :** La conservation à long terme des souches purifiées a été réalisée dans le bouillon MRS contenant 20 % de glycérol et ont été stockées à une température de -20°C. (Badis, 2005).

9) Activité acidifiante des souches :

• Le pouvoir acidifiant :

Le pouvoir acidifiant de bactéries lactiques est l'un des caractères les plus importants en industrie laitière.

Le pouvoir acidifiant des 03 souches de BL est étudié par le suivi du pH et mesure de l'acidité Dornic dans le lait écrémé stérile.

- Cinétique d'acidification dans le lait :

L'étude de la cinétique d'acidification dans le lait pour les 03 souches de BL est réalisée pour la culture pure afin de sélectionner les souches les plus acidifiantes.

- Méthode de mesure du pH :

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures pures en fonction du temps (0h, 3h, 6h, 9h, 14h, 18h, 20h, 24h) et d'autre part à doser simultanément l'acidité Dornic.

Le pH du lait est mesuré après chaque 3 heures pendant 9 heures et après 14 h, 18h, 20 h et 24h à 30°C par le pH-mètre.

- Méthode de mesure de l'acidité Dornic :

Pour 10 ml de l'échantillon à analyser, on ajoute une à deux gouttes de phénophtaléine à 1%. L'acidité est titrée à l'aide de soude N/9 contenu dans une burette de Mohr à robinet et versée goutte à goutte en agitant constamment jusqu'au virage vers une couleur rose pâle persistante au moins pendant 10 secondes. (Larpent, 1997) (Annexe 03).

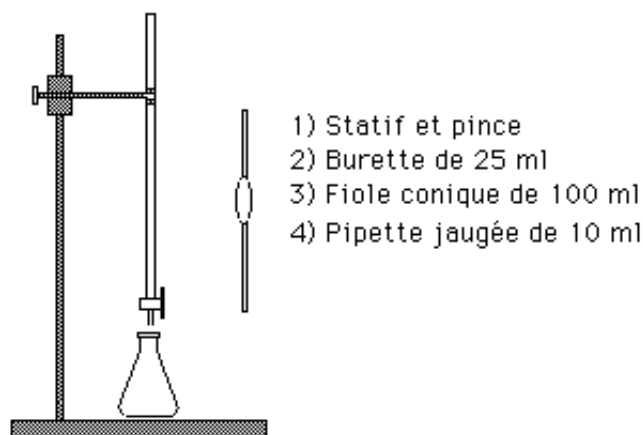


Figure (05) : montre le matériel utilisé pour la mesure de l'acidité Dornic.

Les résultats sont exprimés selon la relation :

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

Où :

- V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.
- Acidité (°D) : L'acidité est exprimée en degré Dornic où $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$ d'acide lactique.

Le test est répété trois fois.

II. Résultats et discussion

1) Vérification de la pureté des souches :

1. Caractérisation macroscopique:

Après avoir effectué une revivification des 03 souches *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*) sur bouillon MRS, l'appréciation doit se manifester par l'apparition d'un trouble après 48h d'incubation à 30°C.

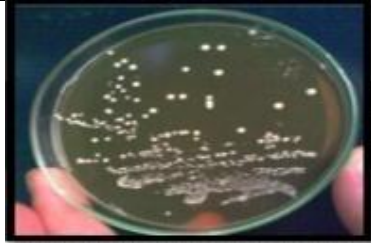
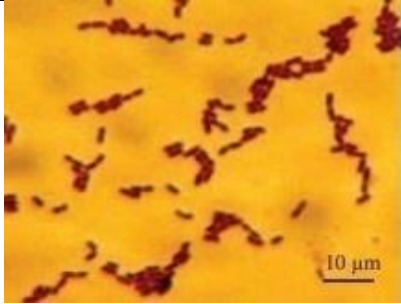

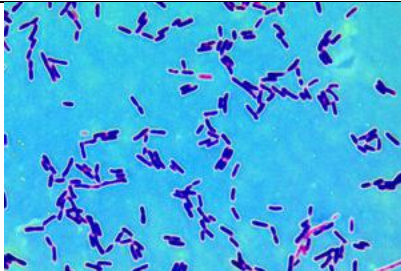
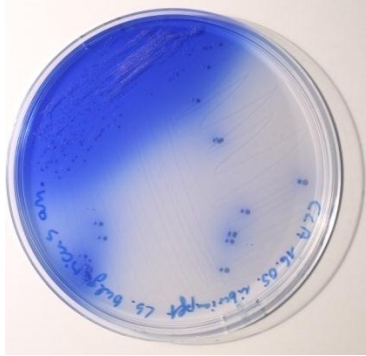
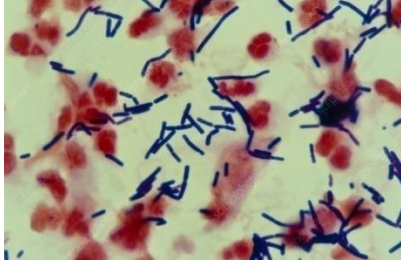
L'étape de purification qui a suivi, permet de décrire les colonies des souches visibles obtenues sur milieu solide MRS après 48h d'incubation à 30°C.

On a observé sur milieu solide des colonies de tailles variables (environ 1,5 à 6 µm) de diamètre, en bâtonnets longs ou courts aux extrémités arrondies, avec une couleur blanchâtre et une surface lisse. **(Tableau 04).**

2. Caractérisation microscopique:

La coloration Gram et le test de catalase qui s'avèrent être des examens clé ont permis de confirmer la pureté des souches lactiques. Elles sont toutes à Gram positives et à catalase négatives. L'examen microscopique a montré que toutes les souches étaient de forme bâtonnet, isolées, en paires ou en chaînes **(tableau 04).**

Tableau 04 : Caractère des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*

Caractères Souches	Aspect des colonies sur gélose	Observation microscopique (Forme, Mode d'association)	Gram	Catalase
<i>Lb. plantarum</i>	 Petites colonies blanchâtres, bombées	 Bâtonnets courts Coccobacilles En chaîne et en paires	+	-
<i>Lb. casei</i>	 Colonies blanchâtres de taille uniforme, lisses	 Bâtonnets courts Bacilles Isolés et en chaîne	+	-
<i>Lb. acidophilus</i>	 Colonies arrondies blanchâtres, rugueuses	 Bâtonnets fins et longs aux extrémités arrondies Coccobacilles Isolées, par paires et en courtes chaînes	+	-

2) L'activité acidifiante :

Le pouvoir acidifiant des souches lactiques demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière. La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirées des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien. L'acidité dans les produits laitiers est communément exprimée en degré Dornic ($1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g/l d'acide lactique}$).

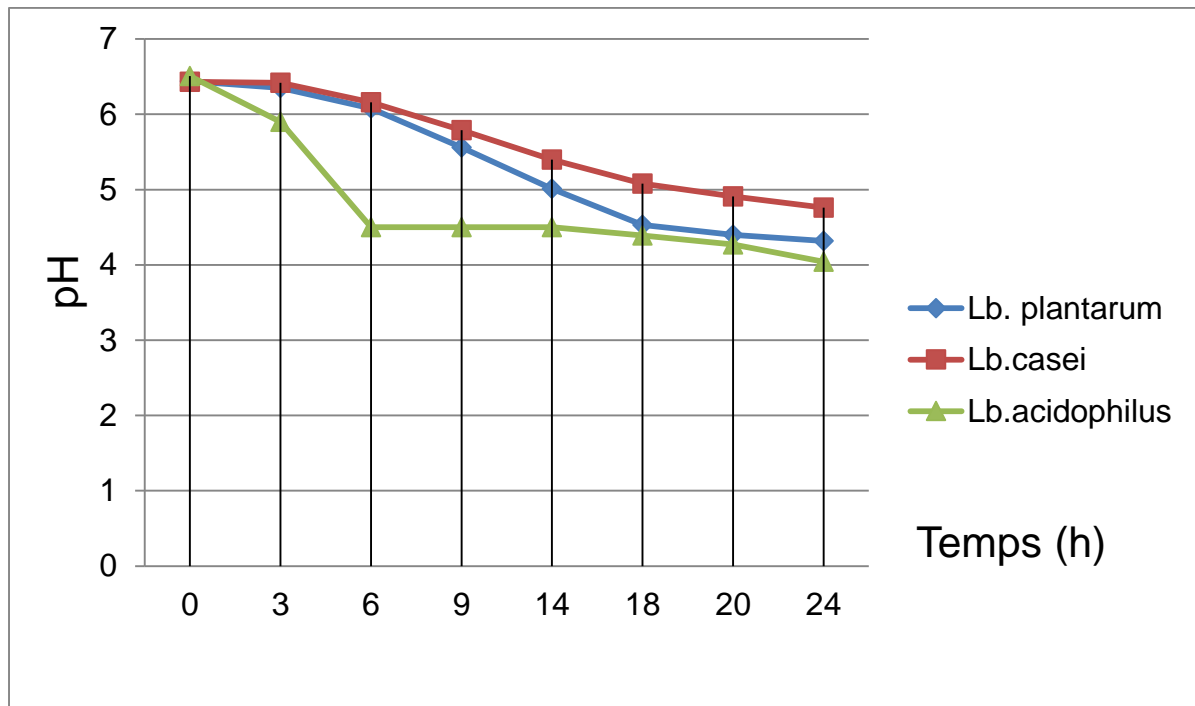
a. Evolution du pH :

L'évolution du pH pendant 24h d'incubation des souches de Lactobacilles est représentée dans le **tableau 05**. (Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions)

Tableau (05) : Représente la cinétique de l'évolution du pH des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*

T(h)	T0	3h	6h	9h	14h	18h	20h	24h
<i>Lb. plantarum</i>	6,44	6,35	6,08	5,56	5,01	4,53	4,4	4,32
<i>Lb. casei</i>	6,43	6,42	6,14	5,79	5,4	5,08	4,91	4,76
<i>Lb. acidophilus</i>	6,51	5,9	4,86	4,5	4,5	4,39	4,27	4,04

Figure (06): Evolution du pH en fonction du temps des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*



Après 03 heures d'incubation, les valeurs du pH des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus* sont de l'ordre 6,35, 6,42 et 5,9 respectivement ; après 18heures d'incubation les valeurs sont nettement différentes, elles diminuent jusqu'à 4,53, 5,08 et 4,39 respectivement.

Au bout de 24heures d'incubation, ces valeurs du pH diminuent jusqu'à 4,32, 4,76 et 4,04 respectivement.

On note que le pH de *Lb. acidophilus* diminue plus vite que celui de *Lb. plantarum* et *Lb. casei*.

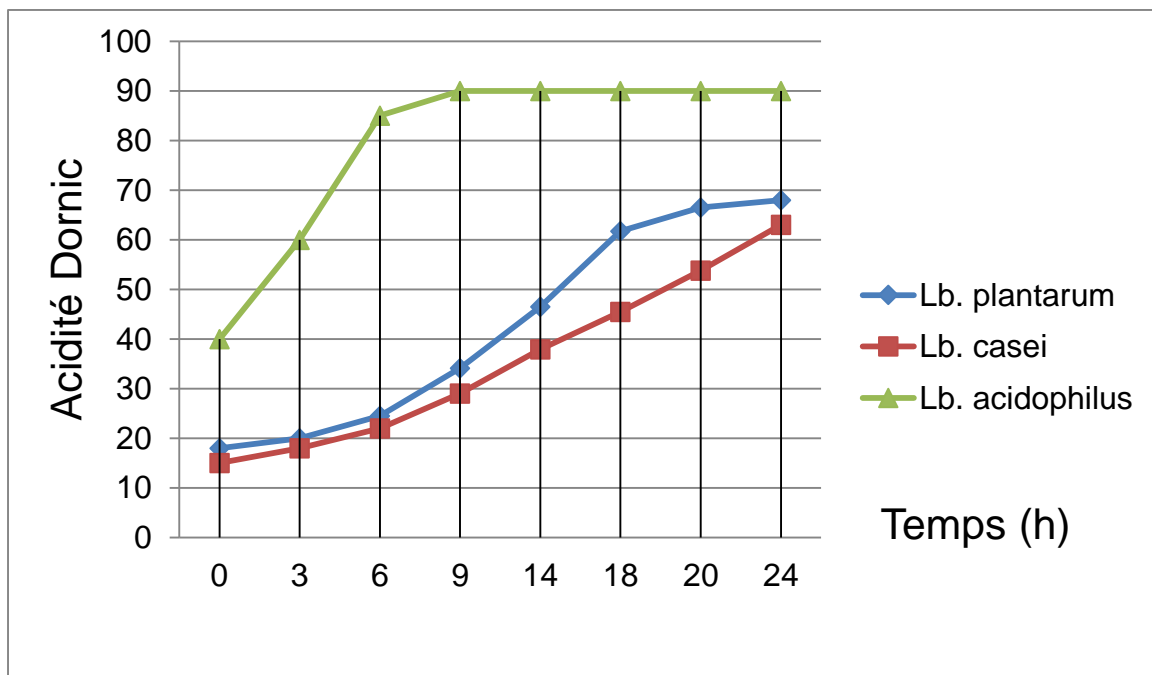
b. Evolution de l'acidité titrable :

L'évolution de l'acidité exprimée en degré Dornic (°D), pendant 24h d'incubation des souches de Lactobacilles est représentée dans le **tableau (06)**. **(Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions).**

Tableau (06) : Représente la cinétique de l'évolution de l'acidité Dornic (°D) des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*

T(h)	T0	3h	6h	9h	14h	18h	20h	24h
<i>Lb. plantarum</i>	18	20	24.5	34.1	46.5	61.7	66.5	68
<i>Lb. casei</i>	15	18	22	29	37.9	45.5	53.8	63
<i>Lb. acidophilus</i>	40	60	85	90	90	90	90	90

Figure (07): Evolution de l'acidité Dornic en fonction du temps des souches de *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*.



Les valeurs portées sur **le tableau (06)** représentent la quantité de l'acide lactique produit par les souches de Lactobacilles ; La souche de *Lb. acidophilus* produit la quantité la plus élevée de l'acide lactique en 24 heures soit 9 g/l, les autres souches à savoir *Lb. plantarum* et *Lb. casei* produisent respectivement 6.8 g/l et 6.3 g/l en 24heures d'incubation.

On note que *Lb. acidophilus* produit une quantité de l'acide lactique la plus élevée par rapport aux autres souches.

3) Discussion générale :

- Au cours de cette étude et d'après les résultats obtenus, nous remarquons une diminution progressive du pH en fonction du temps, accompagnée d'une augmentation plus élevée de l'acidité Dornic. Cette activité acidifiante est variable d'une souche à l'autre.
- La diminution du pH est due à la production d'acide lactique résultant de la fermentation du lactose **(Thomson 1994)**.
- Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation, nous ont permis de classer les souches de *Lactobacillus* en fonction de leur vitesse d'acidification ;
- La souche *Lb. acidophilus* s'avère fortement acidifiante (acidité $\geq 79^{\circ}\text{D}$) ;
- Les souches *Lb. plantarum* et *Lb. casei* classés dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiantes ($79^{\circ}\text{D} > \text{acidité} > 40^{\circ}\text{D}$).
- Dans l'industrie fromagère, la production d'acide lactique et l'abaissement rapide du pH durant la première étape de fabrication de fromage sont d'une importance cruciale. La chute de pH joue un rôle essentiel, d'une part, dans la coagulation du lait en déstabilisant les micelles de caséines, conduisant à la formation du gel, et d'autre part, en donnant à ces produits son goût distinct et caractéristique, contribuant ainsi à leur saveur et arôme, et il intervient aussi, comme inhibiteur des micro-organismes indésirables. **(Tamime et Robinson, 1995)**
- Les souches ayant un profil d'acidification rapide se révèlent comme étant de bonnes candidates pour l'industrie des aliments fermentés, et pourront être utilisées comme cultures starters.
- De la même manière, les souches ayant montré un pouvoir d'acidification faible sont utilisées elles aussi, mais en cultures mixtes, pour d'autres propriétés importantes, par exemple une activité protéolytique élevée.

Conclusion :

Durant notre étude, nous avons utilisé des souches de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*).

Nous avons vérifié la pureté de ces souches lactobacilles par des observations macroscopiques et microscopiques, ce qui nous a confirmé leur pureté.

L'évaluation des aptitudes acidifiantes nous a permis de déduire que nos souches de lactobacilles ont une bonne activité acidifiante dont les valeurs du pH varient entre 4,32 et 4,76. On peut classer *Lb. plantarum* et *Lb. casei* comme des bactéries moyennement acidifiantes, utilisées en phase primaire de fermentation et qui produisent 6,8g/l et 6,3g/l de l'acide lactique respectivement, puis l'utilisation du *Lb. acidophilus* qui est considérée comme une bactérie fortement acidifiante produisant 9 g/l de l'acide lactique.

Enfin, au vue de ces résultats, nous pouvons dire que les souches de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*) se révèlent comme étant de bonnes candidates pour l'industrie des aliments fermentés, et pourront être développé encore mieux par l'utilisation en culture mixte qui augmente le taux de l'acide lactique (acidification) par symbiose qui accélère la coagulation du lait afin d'améliorer la production fromagère.



**Les références
bibliographiques**

A

Atlan, D., Béal, C., Champonier –Vergés, M. C. ,Chapot-Chartier, M. P., Chouayekh, H., Coccagn – Bousquet, M., Deghorain, M., Gadu, P., Gilbert, C., Goffin, P., Guédon, E., Guillouard, L., Guzzo J., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N., Lortal, S., Loubière, P., Maguin, E., Monnet, V., Monnt, V., Rul, F., Tourdot-Maréchal, R., et Yvon, M.,(2008). Métabolisme et ingénierie métabolique In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments Tec & Doc, Lavoisier. Paris. p.271 - 477.

Amanatidou A. Smid E. Bennik MHJ. Gorris LGM. Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. (2001), vol. 203, p. 87- 94.

Adams MR, Moss MO (2000). Food Microbiology. Second Edition, The Royal Society of Biochemistry éd. Cambridge. UK. pp. 318-323.

Axelsson, L. (2004). Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria : Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

B

Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F. M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. P.661-765.

Bergey's Manual. 1986-1989. Manual of determinative bacteriology VILLIAMS and WILKINS, Baltimore.

Badis A, Laouabdia S, Guetarni D, Kihal D et Ouzrout R.(2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle". Sciences & Technologie. P.23, 30-37.

Bottazzi V. 1988 : An introduction to rod shaped lactic acid bacteria. Biochimie. P 70, 303-315.

C

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 70, p. 235-26.

Collins, M.D., U. Rodriques, C. Ash, M. Aguirre, J.A.E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B.A. Phillis, A.M. Williams and S. Wallbanks. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16 rRNA. *FEMS Microbiology letters*. P.77 : 5-12.

Corrieu G, Luquet FM (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments ». TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. Pp: 19- 106.

Chaillou S et al., The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. (2005), vol. 23, p. 1527-1533.

Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. (1987), vol. 46, p. 269 – 280.

D

Desmazeaud MJ, Roissart Hd. Métabolisme général des bactéries lactiques. in *Bactéries Lactiques*. Edition Loriga. (1994), vol.1, p.169-205.

Desmazeaud, M. (1996) Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, pp: 331-343.

De Man, JC, Rogosa M, Sharpe, ME (1960). A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. App. Bacteriol.* P. 23: 130-135.

De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH,(2009).

Desmazeaud, M. (1983) L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Rev. Le lait*, P.63: 267-316.

Dellaglio, F. ; H.DeRoissart ; S.Torriani ; M.C.Curk and D.Janssens (1994). *Bactéries lactiques*, Volume 1. Uriage : Loriga. P.25-30-48.

Desmazeaud Michel J. 1996. Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine utilisation et innocuité agriculture. INRA, unite de recherché laitiers, 78352 Jouy, en Jases codex. France. 5: p.33-343.

Desmazeaud Michel J. 1992. Les bactéries lactiques. CIPILP. P. 200-200-210-300.

De Roissart H et Luquet F.M. 1994. Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques. Lorica, got 604. Volume 1 et 2.

Drider D et Préost H. (2009). Bactérie lactique Physiologie Métabolisme Génomique et application industrielles. Edition : Economica. Paris. 320 - 324p.

De Roissart H.B. (1986). Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.

F

Fitzsimmons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. et Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. P. 65: 3418-3426.

G

Garvie E.I et Farrow J.A.E.1982. *Streptococcus lactis subs cremoris* and *Lactobacillus lactis subs diacetyl lactis*. In J-sut, Bacteriol. P. 32 : 453-455.

H

Hermier J, Accolas et Weber F. 1992. Les groupes microbiens d'interet laitier. CEPIL Paris.

Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis in't Veld J.H.J (1998). Overview of gut flora and probiotics. I.J.Food Microbiol., p. 41 : 85-101.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73(Suppl): 365S–73S.

J

Jozala, A.F., de Lencastre Novaes, L.C., Cholewa, O., Moraes, D., et Penna, T.C.V., 2005. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. Afr. J. Biotechnol. P. 4-3, pp: 262- 265.

K

Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. p. 49: 209-224.

Kandler O et Weiss N. 1986. Regular non sporing gram positive ronds. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*: 108-109. WILLIAMS. WILKINS. Baltimore. Volume2.

L

Lino T, T.Uchimura, Komagata K. The effect of sodium acetate on the activity of L- and D-lactate deshydrogenases in *Lactobacillus sakei* NRIC 1071 and other lactic acid bacteria. **(2003a)**, vol. 5, p. 49-51.

Liu S-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **(2003)**, vol. 83, p. 115-131.

Larpent J.P., 1997. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
Larpent, J. P. (1990). Les fermentations alimentaires. In-Microbiologie alimentaire, Technique & Documentation, Lavoisier, Apria, p. 2-3-17.

Lecterc H, Gaillard J.I et Simon M. 1995. Microbiologie agro industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition DOIN. P. 170-184.

Lenoir J.Hermier J. Et Weber .E ; 1992 : Les groupes microbiens, Ed. Flammarion Médecine en science, p.224.

M

Mietton B. Gaucheron F. and Salaun-Michel F. (2004). Minéraux et transformations fromageres. In *Minéraux et produits laitiers*, (eds. Gaucheron F.), Lavoisier, Paris. Pp. 463-471.

Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In: *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. p. 512-592.

Mataragasa M. Metaxopoulosa J. Galiotoub M, Drosinosa EH. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **(2003)**, vol. 64, p. 265-271.

Makhloufi k. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie en Microbiologie, Biochimie (Ecole doctorale iViv), Paris, 228p.

Mills, D.A., 2004. The Lactic Acid Bacteria Genome Project. Symposium 11: Fermentation Technology. FMS28 J. Food Sci. p. 69: 1-15.

Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K. et Holzapfel, W.H., 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. Int. J. Food Microbiol. P. 94-3-269-278.

Mofred A, Bahloul H, Chanut C. (2007). *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. *Lactococcus lactis*: une bactérie opportuniste. Médecine et Maladies Infectieuses. P. 37 : 200-207.

N

Novel G., (1993). Les bactéries lactiques, in: Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Lavoisier, Paris, p.171-329.

O

Orla Jensen. 1919. The lactic acid bacteria. Copenhagen, commission Hos Ejnar. Munks Gaard. Sert. Sc. P. 5-81-196.

R

Rhee SK, Pack MY. Effect of Environmental pH on Fermentation Balance of *Lactobacillus bulgaricus*. (1980), vol. 144, p. 217-221.

S

Sneath H, Sharp M et Hait J.G. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology.

Schleifer, K. H., Ehrmann, M. Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W and Amann, R. (1995), Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International dairy journal 5. p.108-1094.

Sanders M.E, Leonhard R.J.SING W.D et KLAENHAMMER T.R. 1986. Appt. Microbial. p.52-1001.

T

Tahlaiti Hafida 2019. Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté tel de doctorat de l'université de Abdel Hamid Ibn Badis en science agronomique- microbiologie, Mostaganem, 179p. p.13-16-27.

Tailliez P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Actualités microbiologiques. pp. 35-41.

Thompson, J., Gentry-Weeks, C.R. (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p.239- 290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet 59.

Torrino MI. Taranto MP. Sesma F. Valdez GFd. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH M. (2001), vol. 91, p. 846-852.

Tamime Ay., Marshall V.M.S. and Robinson R.K. (1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented .J. Dairy Res., p.62-151-187.

V

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., kersters, K. Et Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbial Rev p. 60-407- 438.

Y

Yang, G Z., 2000. Antimicrobial compound and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structure and properties. Academic Dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, Department of Food Technology, University of Helsinki 24:227-38. MS. 200.205 ;

Les annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture**Bouillon MRS** :

Composition	Qualité g/l
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

pH=6,4+/-0,2

Autoclave à 121°C/15min

Gélose MRS:

Composition	Qualité g/l
Peptone de viande	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Triammonium Citrate	2
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	13

pH=6,4+/-0,2

Autoclave à 121°C/15min

Annexe 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 min.
- ✓ 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 1 min.
- ✓ Laver à l'eau.
- ✓ Observer à l'objectif X 100, en immersion avec l'huile.

3. L'observation :

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

Annexe 03: Détermination de l'acidité Dornic

1. Matériels :

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

2. Produits :

- ✓ Lait
- ✓ Solution d'Hydroxyde de Sodium N/9
- ✓ Phénolphtaléine à 1%

3. Mode opératoire :

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

$$A=10(V/V') (g/l)$$

Où :

A : Quantité d'acide lactique

V : Volume de la solution de NaOH utilisé

V' : Volume de l'échantillon

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

1°D=0,1ml de NaOH à N/9

Résumé

Une grande quantité de lait de transformation récoltée sert à la fabrication de produits laitiers, comme les fromages, les yaourts et laits fermentés, qui peuvent être des sources des bactéries lactiques particulièrement les lactobacilles.

Notre étude a conduit à la détermination d'activité acidifiante des 03 souches du genre *Lactobacillus* déjà connues, sont : *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*.

Les résultats obtenus indiquent que les souches de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*) présentent un bon pouvoir acidifiant, et se révèlent comme étant de bonnes candidates pour l'industrie des aliments fermentés.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Lactobacillus*, activité acidifiante, fermentation.

ملخص

تُستخدم كمية كبيرة من حليب المعالجة المحصود في تصنيع منتجات الألبان ، مثل الجبن والزبادي والحليب المخمر ، والتي يمكن أن تكون مصادر لبكتيريا حمض اللاكتيك ، وخاصة العصيات اللبنية.

أدت دراستنا إلى تحديد نشاط التخمير لـ 03 من جنس

Lactobacillus plantarum, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن أنواع

(*Lb. plantarum* و *Lb. casei* و *Lb. acidophilus*)

تظهر قوة حمضية جيدة ، وتثبت أنها مرشحة جيدة لصناعة الأغذية المخمرة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، نشاط التخمير ، *Lactobacillus*.

Abstract

A large quantity of harvested processing milk is used in the manufacture of dairy products, such as cheese, yoghurts and fermented milks, which can be sources of lactic acid bacteria, particularly lactobacilli.

Our study led to the determination of acidifying activity of the 03 strains of the genus *Lactobacillus* already known, are: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* and *Lb. acidophilus*.

The results obtained indicate that the strains of *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* and *Lb. acidophilus*) exhibit good acidifying power, and prove to be good candidates for the fermented food industry.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, acidifying activity, fermentation.