



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°/SNV/2017

Mémoire de fin d'études

Présenté par

ZBALAH ROUMAÏSSA

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers

Thème

**Identification et aptitudes
technologiques des bactéries lactiques
du J'ben de chèvre**

Soutenu publiquement le 06/07/2017

DEVANT LE JURY

Président	Mr S.Nemiche	M.C.A	U. Mostaganem
Examineur	Mme F.Benmahdi	M.A.A	U. Mostaganem
Encadreur	Mr A.Homrani	M.C.A	U. Mostaganem
Co- Encadreur	M ^{elle} N.Mghoufel	Doctorante	U. Mostaganem

*Thème réalisé au niveau de laboratoire de recherches des
Sciences et Techniques de Production Animale de l'université de Mostaganem.*

Année Universitaire 2016/2017

Remerciements

Merci à Dieu

Le tout puissant qui m'a donné le courage,

La volonté et la patience pour accomplir ce travail

Je tiens tout d'abord à remercier, Mr Houmrani Directeur de laboratoire des sciences et techniques de production animale à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de diriger ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux vont à M^{elle} Meghoufel pour sa grande disponibilité, son écoute et son suivi tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier :

Mr Nemiche, Docteur à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.

M^{me} Benmehdi, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements :

A M^{elle} Benkerizi pour son aide et sa disponibilité.

Pour finir, je remercie aussi tous mes enseignants et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mon très cher papa, que Dieu te donne la santé et une longue vie

Ma Mère M^{me} MAKBOUL Yamina que ce travail

Soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance

Pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension

A ma très chère H'bibba M^{me} BENMEGHNIA Naima

Pour sa compréhension et son aide

Précieuse dans les moments difficiles

Et tous mes frères :

Hamada, Nesreddinne, Hamza et Abedleghani

A toute la famille ZBALAH et MAKBOUL.

Et à toute la promotion

de 2^{ème} master exploitation des écosystèmes

Microbien laitiers 2016-2017

الليخص

خلال عملنا، قمنا بتوصيف و تحديد العزلات اللبنية المعزولة من جبن الماعز من ولاية النعامة . بعد هذا درسنا بعض القدرات التكنولوجية لبعض السلالات التي تم تحديدها.

ان تحديد 38 عزلات بواسطة طريقة

RESUME

L'étude réalisée nous a permis d'identifier des bactéries lactiques à partir du J'ben de chèvre Algérien issu de la Wilaya de Naâma. Après nous avons testé leurs aptitudes technologiques telles que l'acidité, et l'activité protéolytique, en communauté.

L'identification des 38 isolats par la technique MALDI-TOF MS a révélé une dominance du genre *Enterococcus* environ 66%, et une absence totale du genre *Lactobacillus* dans les échantillons étudiés. Après l'identification, nous avons choisi une communauté de cinq souches différentes pour l'évaluation des aptitude technologique (y compris deux *Leuconostoc mesenteroides*, deux *Lactococcus Lactis*, et un *Enterococcus durans*).

Les résultats obtenus indiquent que la communauté présent un bon pouvoir acidifiant, et aucune activité protéolytique.

Mots clés : Isolats, J'ben de chèvre, identification, communauté, aptitudes technologiques, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

The study carried out, allowed us to identify lactic acid bacteria from Algerian goat's Jben from Naâma. And to test their technological skills, in a community, such as acidity, and proteolytic activity.

The proteomic identification of the 38 isolates by the MALDI-TOF MS technique revealed a dominance of the genus *Enterococcus* was observed about 66%, and a total absence of the genus *Lactobacillus* in the samples studied. After identification, we selected a community of five different strains for assessment of technological suitability (including two *Leuconostoc mesenteroides*, two *Lactococcus lactis*, and one *Enterococcus durans*).

The results obtained indicate that the community has good acidifying power, and no proteolytic activity.

Keywords: Isolates, goat's cheese, identification, community, technological skills, MALDI-TOF MS.

Liste des abréviations :

°D : degré Dornic

Ab : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

DO : Densité optique

E : *Enterococcus*

G+C : Guanine + cytosine

L : *Lactococcus*

Lb: *Lactobacillus*

Ln: *Leuconostoc*

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry

MRS: Man Rogosa Sharp

P: *Pediococcus*

PCA: Plate Count Agar

pH : potentiel d'hydrogène

Sp: Espèce non précisée

Ssp : Sous espèce

St: *Streptococcus*

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les composants aromatiques du Lben traditionnel fabriqué au Maro.....	3
Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques du fromage Bouhezza à dix semaines d'âge.....	5
Tableau 03 : La différence entre les Fromages traditionnels Algériens.....	7
Tableau 04 : Composition de Jben fabriqué à partir du lait de vache	9
Tableau 05 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....	15
Tableau 06 : Souches lactiques de la race Arabia.....	16
Tableau 07 : Souches lactiques de la race Kabyle.....	17
Tableau 08 : Souches sélectionnées pour la construction de la communauté.....	27
Tableau 09 : Résultats de l'activité protéolytique des isolats testés sur milieu PCA lait 2%.....	34
Tableau 10 : Résultats de l'activité protéolytique des isolats positifs sur milieu PCA lait 5%.....	35
Tableau 11 : Suivi du pH des souches et de la communauté sur bouillon M17.....	38
Tableau 12 : Mesures de la Densité optique des souches et de la communauté à 600nm.....	42

Liste des figures

Figure 01 : Schéma du principe de l'identification par MALDI TOF.....	26
Figures02: Identification au MALDI TOF Bruker.....	26
Figure 0 3: Observation de l'aspect macroscopique d'un isolat issu du Jben de chèvre, purifié sur milieu M17 solide	31
Figure 04: Observation microscopique d'une culture pure d'un isolat de Jben de chèvre	32
Figure 05 : Observation du résultat du test nitrate réductase après ajout de la poudre de Zinc.....	33
Figure 06: Observation des résultats obtenus pour l'activité protéolytique pour les isolats	36
Figure 07 : Observation des résultats de la lipolyse des isolats	37
Figure 08: Observation de résultats du test de production d'acétoïne sur lait 0% pour 3 isolats.	37
Figure 09 : Répartition des genres de la collection lactique (%)......	38
Figure 10 : Cinétique de croissance de la souche Lc ND2.....	39
Figure11 : Cinétique de croissance de la souche ND8	40
Figure 12: Cinétique de croissance de la souche ND6	40
Figure 13: Cinétique de croissance de la souche NF3.....	41
Figure 14 : Cinétique de croissance de la souche RI9.....	41
Figure 15 : Cinétique de croissance de la communauté.	42
Figure 16: Observation des résultats obtenus pour l'activité protéolytique de la communauté.	45
Figure 17: Observation des résultats du test de production d'acétoïne sur lait 0% pour la communauté.	45

TABLE DES MATIERES

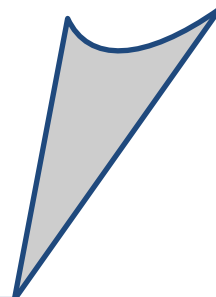


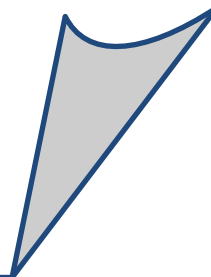
Table des matieres :

RESUME	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
INTRODUCTION:	1
I- LES PRODUITS LAITIERS TRADITIONNELS	3
I.1- LES PRINCIPAUX PRODUITS LAITIERS TRADITIONNELS EN ALGERIE :	3
I.1.1- L'ben :	3
I.1.2- Raïb:.....	4
I.1.3- Smen:	4
I.1.4- Klila ou caséine desséchée:	4
I.1.5- Bouhezza :	4
I.1.6- Lebaa :	5
I.1.7- Laghaunane :	5
I.1.8- Méchouna :	5
I.1.9- Takammart :	5
I.1.10- Madghissa :	5
I.1.11- Aoules:	6
I.1.12. Kémaria :	6
I.2- LE J'BEN.....	8
I.2.1- Définition.....	8
I.2.2- PREPARATION DU JBEN :	8
I.2.3- Les caractéristiques physico-chimiques du J'ben :	9
I.2.4- La microflore de J'ben :	9
I.2.4.1- Flore d'altération	10
II - LES BACTERIES LACTIQUES :	13
II.1 - DEFINITION ET CARACTERISTIQUES	13
II.2 - ORIGINE :	13
II.3 - HABITAT :	14
II.4 - TAXONOMIE:	14
II.5 - DISTRIBUTION DES BACTERIES LACTIQUES DANS LE LAIT DE CERTAINES RACES CAPRINES :	15
II.6 - QUELQUES APTITUDES TECHNOLOGIQUES DES BACTERIES LACTIQUES	17
II.6.1 - Aptitude acidifiante :	17
II.6.2 - Aptitude protéolytique :	18
II.6.3 - Aptitude lipolytique :	18
II.6.4 - Aptitude aromatisante:	19

II.6.5 - Aptitude texturante :	19
II.7 - Rôle des bactéries lactiques :	20
EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE	20
En Santé :	20
III- MATERIEL ET METHODES :	22
III.1- LE BUT	22
III.1.1.Site d'étude :	22
III.2 - SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CROISSANCE	22
III.3-MILIEUX DE CULTURES :	22
III.3 - REVIVIFICATION :	22
III.4 - PURIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES :	22
III.5 - CONSERVATION DES SOUCHES :	23
III.5.1. Conservation de courte durée:	23
III.5.2.Conservation de longue durée :	23
III.6 - PRE- IDENTIFICATION DES SOUCHES ETUDIEES	23
III.6.1 – Observation macroscopique	23
III.6.2 - Etude microscopique	23
III.6.3 - Test catalase :	24
III.6.4 - Test d'oxydase :	24
III.6.5 - Test de la Nitrate réductase :	24
III.7 - ETUDE DE QUELQUES APTITUDES TECHNOLOGIQUES DES ISOLATS :	24
III.7.2 - Activité lipolytique :	25
III.7.3 - Production d'acétoïne :	25
III. 8 - IDENTIFICATION PAR MALDI-TOF :	25
III.9 - LA CONSTRUCTION DE LA COMMUNAUTE :	27
III.10 - APTITUDES TECHNOLOGIQUES DE LA COMMUNAUTE :	27
a- Cinétique de croissance	27
b- Pouvoir acidifiant	28
c- Pouvoir protéolytique et le Pouvoir lipolytique :	29
d- Pouvoir lipolytique :	29
IV-RESULTATS ET DISCUSSION :	31
IV.1 - CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET VERIFICATION DE LA PURETE DES SOUCHES	31
IV.1.1.Aspect macroscopique :	31
IV.1.2 - Aspect microscopique :	31
IV.2 - CARACTERISATION BIOCHIMIQUES DES SOUCHES:	32
IV.2.1 - Test catalase :	32
IV.2.2 - Test oxydase :	32
IV.2.3 - Test de la Nitrate réductase :	32
IV.3 - CARACTERISATION DES APTITUDES TECHNOLOGIQUES DES SOUCHES LACTIQUES	33
a. Activité protéolytique :	33
b.Activité lipolytique :	36
IV.4 - IDENTIFICATION PAR MALDI-TOF :	37

IV.5 - CARACTERISATION DES APTITUDES TECHNOLOGIQUES DE LA COMMUNAUTE	
LACTIQUE :.....	38
a-Cinétique de croissance :.....	38
b-Cinétique d'acidification :.....	42
d- Autres aptitudes technologiques :.....	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48
ANNEXES :.....	54

INTRODUCTION



Introduction:

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utilisables dans le domaine agroalimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées, jouent également un rôle dans la fermentation des hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques ainsi que les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzi et al, 2010).

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

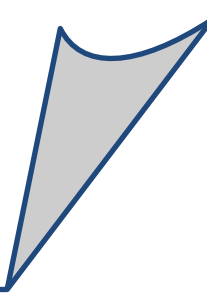
Les technologies laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques. Dans la fabrication fromagère par exemple, elles jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits. Leur action est liée principalement à deux aspects de leur métabolisme: la production d'acide lactiques et l'activité protéolytique (Desmazeaud, 1998)

En Algérie, les fromages traditionnels sont nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés. Environ dix types de fromages sont connus dans les différentes régions du pays (Aissaoui et al., 2011) Pour cela, il conviendrait d'encourager leur fabrication en vue de les faire connaître et maintenir leur existence. Ainsi nous somme intéressé à étudier un fromage traditionnel qui est le « jben » fabriqué

L'objectif de notre travail consiste à identifier des souches lactiques à partir du J'ben de chèvre préparé artisanalement, et tester leur aptitudes technologique telles que l'acidité, et l'activité protéolytique, en communauté.

Chapitre I :

**LES PRODUITS
LAI TIERS
TRADITIONNELS**



I- Les produits laitiers traditionnels

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons et la difficulté de sa préservation sous la forme fraîche qui a conduit au développement des technologies de production traditionnel (Dharam et Narender 2007 in Lahsaoui., 2009). La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (Takahiro et al., 2007; Shan-na et al., 2011). La transformation du lait de chèvre en produits laitiers traditionnels algériens, tels que Raib Lben et Jben est réalisée via une fermentation spontanée (Badis et al., 2004). Ces produits sont partie intégrante de l'héritage algérien, et ont une grande importance culturelle, médicinale, et économique ; ils ont été développés sur une longue période avec les compétences culinaire de fermes en plus de la conservation du lait sous forme solide, plus longtemps à température ambiante (Lahsaoui., 2009).

I.1- Les principaux produits laitiers traditionnels en Algérie :

I.1.1- L'ben :

L'origine de ce produit remonte à des temps immémoriaux, probablement à l'époque où l'homme a commencé à domestiquer les espèces laitières et à utiliser leurs laits. Sa fermentation lactique lui donne son arôme naturel et sa saveur inimitable. Sa préparation artisanale est simple, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10% du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (Ouahghiri, 2009 ; Benkerroum et Tamime, 2004).

Tableau 01 : Les composants aromatiques du Lben traditionnel fabriqué au Maroc (Boubekri et al., 1984 ; Aissaoui,2004) cité par Benkerroum et Tammime (2004).

Composants	Ethanol	Acétoïne	Diacetyl	Acétylaldehyde	Protéine	Lipide	Chlorure	Acide lactique	Extrait sec
Valeurs moyennes (g/l)	17.93	7.3	4.2	1.6	3.44	9.14	1.6	82.6	90.2

I.1.2- Raïb:

Le Raïb fait partie des produits laitiers fermentés populaires en Algérie, en plus du L'ben (lait écrémé fermenté). Le Raïb est une très ancienne tradition en Algérie; il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait, comme de nombreux procédés traditionnels de fermentation, est spontanée et incontrôlée et pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones (Mechai et Kirane, 2008).

I.1.3- Smen:

Le Smen est un produit laitier fermenté, fabriqué à partir du lait cru entier par des méthodes empiriques basées sur des expériences de l'ancien temps. Le beurre fermier obtenu par barattage du lait fermenté est lavé, salé, malaxé puis conditionné dans des pots en terre cuite fermés hermétiquement et entreposés dans un endroit frais et obscur à température ambiante (Sakili et Issoual, 2003 ; Luquet et Corrieu, 2005).

I.1.4- Klila ou caséine desséchée:

Le Klila est un fromage ferme produit empiriquement dans plusieurs régions de l'Algérie, il est fabriqué par un chauffage relativement modérée (55 à 75C°) du L'ben jusqu'à ce que le L'ben se caille (10 à 15 min), le caillé est ensuite égoutté spontanément ou pressé à l'aide d'une pierre, le produit obtenu est consommé tel qu'il est frais au après un séchage ; il est utilisé, après réhydratation, comme un ingrédient dans les préparations culinaires traditionnelles (Mennane et *al.*, 2007). Sous sa forme déshydratée, il peut être conservé plusieurs années à température ambiante, dans des jarres, en poterie ou en verre ou des sacs en peau de chèvre ou mouton. C'est un fromage similaire au Jameed du Moyen-Orient et au Chhana de l'Inde.(Lahsaoui, 2009 ; Boubekri et Ohta,1996).

I.1.5- Bouhezza :

C'est un fromage typiquement fabriqué à partir de lait cru nonensemencé ceci se confirme par sa charge en flore mésophile et de streptocoque lactique, ces germes sont responsables surtout de la diminution concomitante du pH et de l'augmentation de l'acidité (Aissaoui et *al.*, 2006 in Lahsaoui., 2009). Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément dans une outre perméable (Chekoua) avec incorporation de poudre de piment rouge, Le produit peut rester plusieurs semaines voire plusieurs mois avant d'être consommé, il a un goût acidulé fort caractéristique à ce fromage (Zaidi, 2002).

Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques du fromage Bouhezza à dix semaines d'âge (Aissaoui Zitoun et Zidoune, 2006)

	Ph	Acidité	EST	MG/EST	MAT/EST	NST/NT	NaCL
Bouhezza	4	2.08±0,14	35,86±0,8	30.2	0.08	0.38	2,36±0,06

NaCl : Chlorures, Lactates : exprimé en acide lactiques (ces valeurs sont en g pour cent g de produit frais) ; MG : Matière grasse; NST : Azote soluble à pH 4,6, MAT : matière azotée total ; EST: extrait sec total.

I.1.6- Lebaa :

La matière première est le colostrum, parfois il est mélangé avec des oeufs, il est salé puis bouillit pendant 15 mn environ. Le produit obtenu est appelé lebaa (Lemouchi., 2008).

I.1.7- Laghaunane :

Fromage fabriquée en Kabylie à partir du colostrum, la préparation se fait dans des ustensiles en terre cuite enduits d'huile d'olive dans lesquels est versée une petite quantité d'eau salée, puis le lait est chauffé et coagulé. Le caillé formé est découpé puis consommé tel quel (Agroligne, 2001 *in* Lahsaoui, 2009).

I.1.8- Méchouna :

Il est fabriqué à partir du lait cru qui est chauffé jusqu'à ébullition. Ensuite, on ajoute de lait fermenté l'ben ou rayeb et du sel. En utilisant une gaze, le mélange est laissé égoutter. Il est consommé frais ou avec la galette (Lemouchi., 2008).

I.1.9- Takammart :

D'après Hellal (2001), c'est un Fromage du Hoggar, sa fabrication se fait par introduction d'un morceau de caillette de jeunes chevreaux dans le lait, après quelque heures le caillé est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte et sera ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé sur une autre natte faite de tige de fenouil sauvage qui lui donne de l'arôme. Les nattes sont ensuite placées à l'ombre jusqu'à durcissement du fromage. Le fromage peut subir un affinage durant un mois (Gast et coll., 1969 cité par Abd Elaziz et Ait Kasi, 1992).

I.1.10- Madghissa :

Le fromage est connu dans la zone de chaouia, à l'est du pays. Il est préparé avec du klila frais après salage et incorporation du lait frais. L'ensemble est porté à ébullition sur feu Doux jusqu'à séparation du caillé et du lactosérum. Après refroidissement du mélange,

la Marmite est basculée pour éliminer le lactosérum. Le fromage ainsi préparé est une pâte jaune Salée et élastique appelée madghissa (Aissaoui., 2003).

I.1.11- Aoules:

Il est fabriqué à partir du lait de chèvre qui est extrêmement aigre. Après une coagulation intense, le fromage obtenu a une pâte dure (matière sèche représente 92%). L'égouttage se fait dans de la paille, ensuite, il est reformé sous forme des boules plates séchées au soleil, il peut être consommé en mélange avec les dates (Abdelaziz et Ait kaci., 1992).

I.1.12. Kémaria :

kémaria est un type de fromage traditionnel qui caractérise une place très importante dans la société, d'une valeur de consommation très remarquable autochtone de la wilaya de Ghardaïa. Il est fabriqué par le lait cru de vache pour une fabrication industrielle et à base de lait de chèvre pour une fabrication domestique. La Kémaria peut être également obtenu à partir du lait de chamelle après mélange avec du lait de vache ou lait de chèvre en utilisant une présure animal ou végétale (un extrait d'artichaut disponible dans le commerce) à raison de 20g pour 20litre de lait pendant 1/2 heure jusqu'à sa coagulation. Vingt minutes après, il y a la séparation du liquide qui reste, puis le moulage. (Harrouz et Oulad hadj, 2007).

Tableau 03: La différence entre les Fromages traditionnels Algériens.

Fromage	Matière première	Ajout	Conservation	Observation
Kémaria	Lait	Présure animale et végétale	Frais	Consommé frais avec le thé
Bouhezza	Lait et lben	Piment rouge	Dure	Salage, Egouttage et l'affinage sont réalisés simultanément (Zaidi., 2002)
Jben	Lait	présure animale et épices		peu salé ou additionné d'épices ou de plantes aromatiques (Abdelazis et Ait Kaci., 1992)
Klila	Lben		Frais	additionnée à certains plats traditionnels (Touati., 1990)
Takammart	Lait	Présure animale		peut subir un affinage durant un mois (Hellal., 2001)
Lebaa	Colosterum	Parfois des œufs	Frais	salé puis bouilli (Lemouchi., 2008)
Méchouna	Lait cru	Lben ou rayeb et sel		consommé frais avec la galette (Lemouchi., 2008)
Madghissa	Lait frais	Klila	Frais	pâte jaune salée et élastique (Aissaoui., 2003)
Aoules	Lait de chèvre		Pates dure	L'égouttage dans une paille. consommé avec les dates (Abdelazis, Ait Kaci., 1992)

I.2- Le J'ben

I.2.1- Définition

Selon la norme du Codex Alimentaires et la norme internationale FAO/OMS (2005), le fromage frais ou non affiné est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française, la dénomination «fromage» est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'un égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours (Luquet et Corrieu., 2005).

Le J'ben est un fromage traditionnel frais obtenu soit par coagulation enzymatique (présure extrait à partir de la caillette de veau) soit par la coagulation lactique . Le lait destiné à la fabrication est chauffé, une fois tiède, un fragment de caillette bovine est macéré dans le lait. Après coagulation du lait et égouttage, le caillé ainsi obtenu peut être salé ou additionné de quelques épices ou de plantes aromatiques. (Lahsaoui., 2009).

I.2.2- Préparation du jben :

Le J'ben est fabriqué soit à partir du lait de vache ou du lait de chèvre ou de brebis . Le processus de fabrication nécessite trois grandes étapes essentielles : la maturation, la coagulation et l'égouttage (Randazo et *al.*, 2002).

A/ La maturation C'est l'incubation du lait cru à température ambiante pendant un temps variable de façon à favoriser la multiplication d'une flore lactique qui va jouer un rôle important dans l'acidification du lait. (Randazo et *al.*, 2002).

B/La coagulation C'est une opération qui vise à coaguler le lait au moyen de la présure (emprésurage) ou de toute autre enzyme coagulante. L'activité coagulante est déterminée par la force de présure, la température du lait et son acidité. Après l'emprésurage, le lait est abandonné au repos à température ambiante pendant 6 à 10 heures. Il va prendre masse (caillage) avec une consistance plus ou moins ferme selon le degré d'acidité développé.

C/L'égouttage : Un des buts essentiels de cette opération est de régler la teneur en eau du fromage. Il permet l'élimination de la plus grande partie du Lactosérum qui imprègne le coagulum. L'égouttage se fait dans des moules qui confèrent au fromage sa forme. La nature du gel influe sur la conduite de l'égouttage. Un gel lactique subit un égouttage

spontané et le caillé a par conséquent une forte humidité. Cependant, un gel présure est un gel compact, solide ou l'égouttage ne peut avoir lieu qu'après certaines interventions telles des actions mécaniques de pression.

Suivant le goût, le salage peut être fait. C'est une opération importante dans la fabrication des fromages. Elle a des effets multiples : elle améliore l'égouttage en le complétant, elle oriente et sélectionne le développement microbien et relève la saveur de la pâte (Kbibou, 1987; Benkerroum et Tamime 2004).

I.2.3- Les caractéristiques physico-chimiques du J'ben :

Le fromage frais « J'ben » ne présente pas de caractéristiques définies à cause des méthodes artisanales utilisées pour sa préparation, reposant essentiellement, sur les connaissances acquises à partir d'une longue expérience (Salmeron *et al.*, 2002). Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (Poznanski *et al.*, 2004). Généralement, Le pH (< 4,2) et l'acidité titrable (> 0,9%) sont les paramètres les moins variables du « J'ben ». Cependant, les matières solides totales du J'ben sont le facteur le plus variable car ce dernier dépend de la durée d'égouttage. Étant donné que les lipides, le lactose et les protéines constituent les principaux composants de l'ensemble des matières solides en « J'ben », ils sont directement influencés par les variations des dites matières solides (Benkerroum et Tamime., 2004). De nos jours, J'ben est également préparé à partir de lait pasteurisé. Les caractéristiques finales d'un J'ben typique sont variables et affectées par le préparation du fromage (Ouahghiri *et al.*, 2005).

Tableau 04 : Composition de Jben fabriqué à partir du lait de vache (en pourcentage)

(Abdelaziz et Ait Kaci, 1992).

Compositions	Eau	Matière grasse	Protéine	Calcium
Jben	65.27	18.72	13.73	0.14

I.2.4- La microflore de J'ben :

La composition microbiologique du fromage dépend de celle du lait de départ, du processus de fabrication qu'il a subi et de l'âge du fromage (Ercolini *et al.*, 2009). Généralement, elle est dominée par les bactéries lactiques en l'occurrence les genres

Lactococcus et *Enterococcus* qui influencent les caractéristiques sensorielles du produit fini (Randazzo *et al.*, 2009).

I.2.4.1- Flore d'altération

Ce sont des bactéries et des champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les bactéries psychrotrophes, les levures et moisissures (Abdessalam ., 1984).

a) Flore thermorésistante:

Les composantes de cette flore sont: *Micrococcus*, *Microbacterium* et *Bacillus* dont l'espèce *cereus* produit une entérotoxine C'est la flore de contamination provenant le plus souvent de la machine à traire ou du tank et non détruite par la chaleur. *Clostridium perfringens* est l'une des causes de toxi-infection alimentaire. Après incubation de 8 à 22 heures, des troubles légers et passagers apparaissent : diarrhée profuse, aqueuse, ballonnement et douleurs abdominales.

b) Les coliformes:

D'un point de vue technologique, certains coliformes proviennent du lait lui-même et fermentent le lactose sur un mode hétérofermentaires. De plus, ces bactéries élaborent diverses substances qui provoquent le gonflement précoce des produits laitiers, dont le fromage. Un grand nombre d'entre elles étant bactéries habituelles de des mammifères, leur présence dans le lait tout comme dans l'eau, est l'indice d'une contamination fécale. Cet indice est mis à profit dans l'examen de la qualité des produits (Cisse., 1997).

c) Les psychrotrophes:

Le terme « psychrotrophe » désigne des micro-organismes qui ont la Faculté de se développer à une température inférieure à +7°C, indépendamment de leur température de croissance plus élevée. Parmi les micro-organismes qui composent ce groupe, nous pouvons citer:

- Gram (-) : *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*.

- Gram (+) : *Micrococcus*, *Corynebactérium*.

En général dans le lait et les produits laitiers ; c'est le genre *Pseudomonas* qui domine. Il est fortement psychrotrophe et il se multiplie par 100 en 48 heures à +4°C. Ces germes produisent des lipases et des protéases thermorésistantes ayant pour conséquence

l'apparition de goûts très désagréables dans les produits laitiers : goût amer, rance, putride (Hicks *et al.*, 1985; Jooste *et al.*, 1985 in Leveau et Bouix., 1993).

d) Levures et moisissures:

Les levures et moisissures sont des cellules eucaryotes rattachées au règne végétal par leur structure cellulaire. Regroupées sous le vocable de flore fongique, elles peuvent être retrouvées aussi bien dans le lait cru, le lait en poudre que dans tous les autres produits laitiers (Abdessalam., 1984).

Les levures: De forme arrondie ou ovale, volumineuses ou unicellulaires, les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatisation. Elles sont aérobies facultatives et se développent en surface formant les boutons de nature mycélienne (47). Par contre, d'autres levures peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments ; ce sont :

- *Kluyveromyces fragilis* - *Kluyveromyces fragilis* - *Saccharomyces fragilis* - *Saccharomyces lactis*.

Les levures supportent des pH de 3 à 8 avec un optimum de 4.5 à 6, ce qui explique leur présence dans le lait cru comme dans le lait Caillé (8). Elles entraînent des altérations rendant le produit final répugnant: aspect trouble, odeurs désagréable, gonflement des produits ou de leur emballage (Hicks *et al.*, 1985; Jooste *et al.*, 1985 in Leveau et Bouix, 1993).

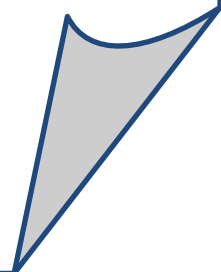
Les moisissures : Les moisissures sont en général plus complexes dans leur morphologie et dans leur mode de reproduction. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées. Elles peuvent être utiles ou indésirables en industrie alimentaire à partir du lactose; cette propriété leur confère une utilité incontestable en fromagerie. C'est ainsi que *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* sont utilisées dans la fabrication de divers types de fromages (Hicks *et al.*, 1985; Jooste *et al.*, 1985 in Leveau et Bouix, 1993).

Chapitre II :

LES

BACTERIES

LACTIQUES



II - Les bactéries lactiques :

II.1 - Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles ont souvent des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (De Roissart, 1986 ; Dellaglio *et al.*, 1994).

Elles forment un groupe hétérogène, dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Ait Belghanaoui, 2006) , qui est composé de coques et de bacilles, Gram positif, asporulées, généralement non mobiles, anaérobies. Comme elles ne possèdent pas de cytochrome, ces bactéries ne tirent pas leur énergie de la respiration, mais plutôt par phosphorylation du substrat au cours de la fermentation des sucres (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Prescott *et al.*, 2003).

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent être néfastes ; ceci est probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le H_2O_2 doit être éliminé car son accumulation devient toxique pour les microorganismes producteurs. Le système enzymatique le plus efficace d'élimination de H_2O_2 est la catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes.

Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le H_2O_2 elles sont considérées comme « micro-aérophiles» (Larpent *et al.*, 1997; Bourgeois *et al.*, 1996).

Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (Muto et Osawa, 1987)

II.2 - Origine :

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie ; de plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni *et al.*, 2001).

II.3 - Habitat :

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

II.4 - Taxonomie:

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

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires ; cependant, la caractérisation phénotypique, biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996; Stiles et Holzopfel, 1997; Ho *et al.*, 2007).

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

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

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

Le genre *Bifidobacterium* est considéré par plusieurs auteurs comme un 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* (Stiles et Holzopfel, 1997; Pilet et al., 2005).

Parmi les bactéries lactiques, *Lactobacillus* présente le genre le plus répandu. Ce dernier comprend à lui seul de nombreuses espèces qui diffèrent par leurs caractéristiques phénotypiques, biochimiques et génétiques (Vandamme et al., 1996).

Le tableau 05 montre les principales caractéristiques de quelques genres de bactéries lactiques :

Tableau 05 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	Thermophile ou mésophile	Groupe 1 :23 Groupe 2 :16 Groupe 3 :22
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophile	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophile ou thermophile	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophile	11
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophile	25

II.5 - Distribution des bactéries lactiques dans le lait de certaines races caprines :

Les premiers travaux sur les bactéries lactiques ont été réalisés par Badis et ses collaborateurs en 2004. Ils ont montré que le lait cru de chèvre présente un écosystème

favorable au développement de 6 genres de bactéries lactiques (Tableau 06 et 07). Les espèces des genres *lactobacillus* et *lactococcus* dominent cette microflore lactique (Badis et al., 2004a ; Badis et al., 2004b; Badis et al., 2005 ; Badis et al., 2006).

Tableau 06 : Souches lactiques de la race Arabia (Badis et al., 2005)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lc. Lactis</i> Biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Ln. Lactis</i>	<i>Weissella</i> <i>para-mesenteroide</i>	<i>P. damnosus</i>
<i>Lb. plantarum</i>		<i>Lc. Lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	<i>Ln. Pseudo-mesenteroide</i>		<i>P. acidilactici</i>
<i>Lb. Casei</i> <i>subsp. rhamnosus</i>		<i>Lc. Lactis</i> <i>subsp. cremoris</i>	<i>Ln. mesenteroide</i> <i>s subsp. dextranicum</i>		<i>P. parvulus</i>
<i>Lb. delbreukii</i> <i>subsp. lactis</i>		<i>Lc. plantarum</i>	<i>Ln. amylibiosum</i>		
<i>Lb. brevis</i>					
<i>Lb. casei</i> <i>subsp. casei</i>					
<i>Lb. acidophilus</i>					
<i>Lb. animalis</i>					
<i>Lb. amylophilus</i>					

Tableau 07 : Souches lactiques de la race Kabyle (Badis *et al.*, 2005)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lb. delbreukii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Ln. Lactis</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>P. damnosus</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Lc. Subsp hordniae</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> Subsp. <i>cremoris</i>		
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>		<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>			
<i>Lb. brevis</i>		<i>Lc. plantarum</i>			
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>		<i>Lc. Graviae</i>			
		<i>Lc. Raffinolactis</i>			

II.6 - Quelques Aptitudes technologiques des bactéries lactiques

II.6.1 - Aptitude acidifiante :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques. Utilisées dans les industries alimentaires, elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008). Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (Béal *et al.*, 2008) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés.
- Abaissement progressif du pH.

- L'imitation des risques de développement de flore 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 *et al.*, 2008).

II.6.2 - Aptitude protéolytique :

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et en acides aminés ; ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. L'activités protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage, et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Buist *et al.*, 1998).

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du gout ou des arômes, la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes, En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques, ceci, après leur dégradation par la flore d'affinage (Schirch *et al.*, 1985 ; Ottet *et al.*, 1997).

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

II.6.3 - Aptitude lipolytique :

L'activité lipolytique joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés, bien que parfois, elle soit à l'origine d'altérations (Franz *et al.*, 2003). Ces propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les Lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que

Streptococcus thermophilus et les Lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal *et al.*, 2008).

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

II.6.4 - Aptitude aromatisante:

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

L'acétaldéhyde est un composant important de l'arôme des produits fermentés. Des exemples de bactéries productrices d'acétaldéhyde : *Lactococcus lactis* ssp. *biovar lactis diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Walstra *et al.*, 1999).

II.6.5 - Aptitude texturante :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important dans la consistance et la rhéologie des produits transformés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007). La plupart des bactéries lactiques synthétisent les polysaccharides ; certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, d'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharide" (EPS) (Topisirovic *et al.*, 2006).

Les EPS ont l'avantage d'être « naturels », requis en faible concentration et ne peuvent être remplacés par les agents stabilisants pour leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation en bouche des laits fermentés (Marshall et Rawson, 1999). Ils peuvent alors servir d'émulsifiants ou d'agents gélifiants (Welman *et al.*, 2003)

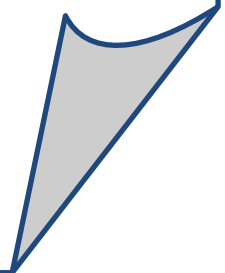
Dans le cas des deux bactéries du yaourt: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *Bulgaricus*, la production d'EPS est régulée par plusieurs gènes au niveau chromosomique (Cerning, 1995). Généralement, pour les bactéries thermophiles, la production d'EPS est associée à la croissance bactérienne (Petry *et al.*, 2003).

II.7 - Rôle des bactéries lactiques :

En industrie agroalimentaire: les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires ; elles sont ajoutées, volontairement, comme starters en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Elles fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bioconservation des denrées alimentaires (Carmen *et al.*, 2000 ; Stiles et Holzapfel, 1997 ; Leroy et de Vuyst, 2004 ; Pot *et al.*, 2008).

En Santé : Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques (Givry, 1996). Elles apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtychyan *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011).

Partie
Pratique :
**Matériel et
Méthodes**



III- Matériel et méthodes :

III.1- Le But

L'objectif de notre travail consiste à identifier des souches lactiques à partir du J'ben de chèvre artisanal, et de tester leurs aptitudes technologiques telles que l'acidité, et l'activité protéolytique, l'activité lipolytique et la production d'acétoïne individuellement ; mais aussi en communauté.

III.1.1.Site d'étude :

L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche des : Sciences Techniques de Production d'Animal (LSTPA) à L'exploitation agricole de Hassi Mammeche, ainsi qu'au laboratoire pédagogique de Chimie n°1 de l'université de Mostaganem .

III.2 - Souches bactériennes et conditions de croissance

75 souches bactériennes isolée à partir du J'ben de chèvre de la région de Naama ont été utilisées au cours de cette étude.

III.3-Milieus de cultures :

Milieu PCA (Plat Count Agar): la recherche de la flore mésophile totale.

Milieu M17: l'isolement des lactocoques.

MRS (Man, Regosa et Sharpe) gélose: l'isolement et purification des bactéries lactiques

III.3 - Revivification :

La revivification des souches a été faite sur des milieux liquides (MRS ou M17).

III.4 - Purification des bactéries lactiques :

La purification est réalisée sur gélose (MRS ou M17). Des repiquages successifs ont été effectués en prélevant une colonie d'une culture bactérienne sur milieu solide/gélosé dans une boîte de pétri, pour l'ensemencer sur un autre milieu solide par la méthode des stries. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des culture pure.

La pureté des souches est contrôlée par observation microscopique après coloration de Gram, Et un test de catalase après chaque repiquage.

Les bactéries Gram positif et catalase négative sont retenues.

III.5 - Conservation des souches :

Tous les isolats suspects des bactéries lactiques (gram positif et catalase négatif) sont conservés :

III.5.1. Conservation de courte durée:

Cette méthode est utilisée pour une conservation des souches à courte durée. Les souches pures sontensemencées sur bouillon MRS/M17 et conservées à 4°C, et le renouvellement des souches se fait toutes les 04 semaines.

III.5.2. Conservation de longue durée :

Elle est employée pour une conservation des souches de un à plusieurs mois. Elle s'effectue en congelant des cultures jeunes,ensemencées massivement sur milieu MRS ou lait 0% + cryoprotecteur à 30% (dont le glycérol joue le rôle d'un cryoprotecteur) (Champagne *et al.*, 2000).

III.6 - Pré- identification des souches étudiées

on dispose de quelques tests pour analyser les caractères généraux des bactéries lactiques qui se basent sur l'observation des caractères morphologiques des bactéries lactiques ainsi que de certains caractères biochimiques: Bernnan *et al.*, (2001).

III.6.1 – Observation macroscopique

Ce test consiste en une observation directe (à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire) des colonies obtenues sur milieux MRS/M17 solide et liquide.

Il permet de nous renseigner sur la forme, la taille, et la couleur des colonies ainsi l'aspect du trouble dans le milieu liquide (Badis *et al.*, 2005).

III.6.2 - Etude microscopique

a) observation à l'état frais

Observation à l'état frais d'un frottis bactérien étalé entre une lame et une lamelle dans une goutte d'eau distillée stérile au grossissement x40

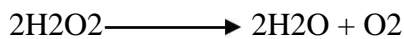
b) coloration de Gram

les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (voir annexe 3) .

Cette étude permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (Singleton., 1999).

III.6.3 - Test catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal et *al.*, 1991).

III.6.4 - Test d'oxydase :

Les oxydases interviennent à la fin des étapes de déshydrogénation des chaînes de cytochromes. Il en existe plusieurs types. Elles sont mises en évidence par leur propriété de catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique par l'oxygène de l'air.

Un disque « OX » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau puis une parcelle de la culture est déposée à la surface. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

III.6.5 - Test de la Nitrate réductase :

Ensemencement de 1 % de chaque isolat dans du bouillon nitraté . Après incubation à 30°C pendant 24h à 48h heures, nous avons ajouté quelque goutte de NR1 et de NR2. Après 15 min on observe.

Le résultat est positif s'il y a apparition d'une coloration rouge dans le milieu.

S'il n'y a pas de changement de couleur, on ajoute de la poudre de Zinc : le résultat est positif si la couleur reste jaune. Le résultat est négatif s'il y a apparition d'une coloration rouge au niveau du milieu.

Les bactéries cat- ox- Nit- G+ sont retenues pour la suite des tests car elles sont présumées êtres des bactéries lactiques.

III.7 - Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats :

Afin de sélectionnée certaines souches de bactéries lactiques pour construire une communauté ; on a testé le pouvoir protéolytique, lipolytique et la production d'acétoïne des souches de bactéries lactiques confirmées.

III.7.1 - Activité protéolytique :

Cette propriété est importante pour la fabrication du produit laitier surtout pour la fabrication de fromage et notamment la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques de produit final.

Ce test est réalisé sur milieu Plate Count Agar (PCA) additionnée de lait écrémé à 2% et 5%, 10%. On ensemence 5µl d'une culture jeune de chaque souche en touche à la surface du milieu solide et à des distances égales les unes des autres. On laisse les souches sécher et on incube les boîtes à 30°C pendant 24h à 48h.(Thapa *et al.*, 2006)

La lecture :

L'effet protéolytique est traduit par l'apparition des halos clairs autour des colonies bactériennes. Les halos les plus larges indiquent que les souches ont une activité protéolytique plus importante.

III.7.2 - Activité lipolytique :

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière a été coulée et solidifiée. les souches à tester sontensemencée simultanément en touche à la surface du milieu de culture à l'aide d'une anse. Après une incubation à 30 °C pendant 48 heures, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement autour des touches (Guiraud, 2003).

III.7.3 - Production d'acétoine :

La capacité des isolats lactiques à produire de l'acétoine a été recherchée après croissance des isolats dans du lait écrémé stérile, après incubation à 30°C pendant 24h; deux gouttes de VPI et deux gouttes de VPII (alpha-naphthol and potassium hydroxide, réactifs I et II de Voges Proskauer) ont été ajoutés au lait et laissés reposer. Les isolats qui ont produit un anneau rose à la surface du lait ont été notés positif pour la production d'acétoine.

III. 8 - Identification par MALDI-TOF :

Meilleurs résultats au test de protéolyse ont été choisie pour l'identification au MALDI-TOF.

La technique MALDI-TOF MS permet l'analyse des protéines solubles de faible masse moléculaire, qui sont ionisé à partir de cellules entières de bactéries et permet l'identification bactérienne en quelques minutes avec une grande précision par rapport à l'analyse génétique de routine. Récemment, cette approche a été utilisée avec succès pour

différencier les bactéries lactiques dans des aliments et des yaourts probiotiques (Tanigawa *et al.*, 2010 ; Angelakis *et al.*, 2011).

Après avoir sélectionnées 46 souches pour l'identification au MALDI, nous avons purifiées les souches sur milieu solide MRS ou M17 à 30°C pendant 24h.

Les boites de purification a tester sont transportées au CRAPC (de bousmail) où l'identification a été faite comme suit :

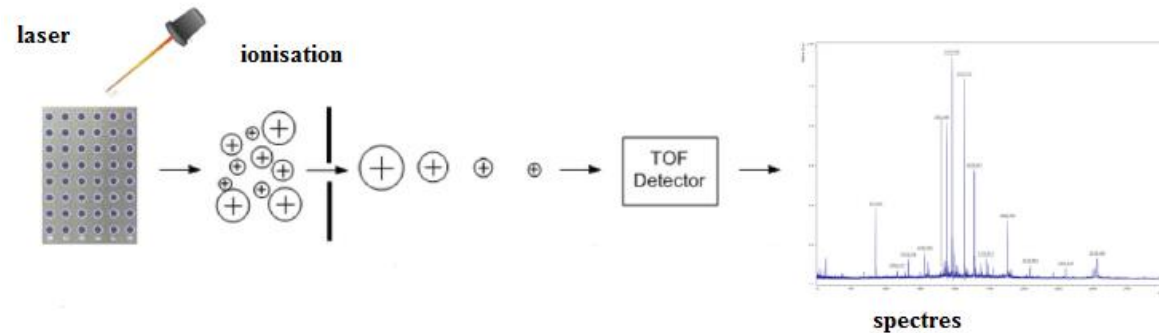


Figure 01 : Schéma du principe de l'identification par MALDI TOF



Figures02: Identification au MALDI TOF Bruker (l'appareil – la plaque cible — tableau des résultats

à l'aide d'un cure-dent stérile on récupère 1 à 3 colonies puis on les étale sur un emplacement de 3mm de diamètre sur une plaque cible, on ajoute 1µL de matrice (une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamiq, Bruker Daltonyk,Germany)HCCA + 1µL d'acide formique.

-on laisse sécher à l'air libre, la plaque puis on l'introduit dans l'appareil.

-l'analyse se fait grâce au programme MALDI Byotyper, les résultats sont présentés sous forme de spectre.

-ensuite les spectres des souches sont comparés avec une banque de spectres incluant un grand nombre de bactéries enregistrées,

-après un calcul des similarités, un score est donné à chaque souche pour permettre une identification précise des espèces.

III.9 - la construction de la communauté :

Après avoir identifié les souches bactériennes au MALDI, nous avons sélectionné cinq souches de bactéries lactiques différentes pour 3 genres différents, pour construire une communauté et tester ses aptitudes technologiques.

Les cultures overnight à 30°C sur bouillon M17 des 5 souches sont ajusté à une concentration de 10⁶ ufc/ml puis un volume de chaque culture estensemencé avec les autres lors des tests suivants (1 :1 :1 :1 :1)

Tableau 08 : Souches sélectionnées pour la construction de la communauté

Code de la souche	ND2	ND6	ND8	NF3	RI9
identification	<i>Leuconostoc mesenteroide</i> s	<i>Lactococcus . Lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroide</i> s	<i>Lactococcus . Lactis</i>	<i>Enterococcus durans</i>

III.10 - Aptitudes technologiques de la communauté :

Les caractères d'une souche dite « performante » étant son pouvoir acidifiant, son activité protéolytique et sa stabilité en culture mixte (Cogan *et al.*, 1997).

à partir de la communauté choisie nous avons effectué une étude technologique de ces souches en communauté.

a- Cinétique de croissance

La cinétique de croissance permet de calculer le taux de croissance d'une souche à un moment donné. Elle consiste à suivre l'évolution du pH avec mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 600nm.

Les mesures sont réalisées à intervalle de temps déterminé ; de 0 à 24h.

Le calcul du taux de croissance est effectué par la formule suivante (Thirabunyanon *et al.*, 2009) :

$$\% \text{ de croissance} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100$$

Ensemencement à raison de 1% d'une culture overnight de 10⁶ ufc/ml de chaque souche ainsi que de la communauté dans du bouillon M17, et incubation à 30°C, suivre l'évolution du pH et due la DO à : 0h- 2h- 4h- 6h et 24h

b- Pouvoir acidifiant

L'un des critères technologiques les plus importants chez les bactéries lactiques, est leur cinétique de production d'acide lactique (Hassain, 2013).

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acide lactique par la soude.

Chaque souche a étéensemencée d'abord sur milieu MRS liquide et incubée à 30°C pendant 18 h, ensuite 100 µL de la culture précédente ont été inoculées dans une série de tube de 10 ml chacun de lait écrémé reconstitué à 11%, à 0% de matière grasse. La série est utilisée pour étudier la cinétique d'acidification (Kihal, 1996).les tubes vont être incubés à 30°C. pour 0-2-4-6-24h, deux tubes vont être sortis pour suivre l'évolution de l'acidité et du pH (Kihal *et al.*, 2007).

Mesure de pH

Le pH du lait a été mesuré par un pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois que nous procédions au dosage de l'acide lactique (Guiraud, 2003).

Activité titrable

L'acidité Dornic du lait ou produit laitier, c'est la quantité d'acide lactique libéré par transformation du lactose en acide lactique en présence des bactéries lactiques. L'acidité Dornic du lait est exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lait (Aggad *et al.*, 2009).

Titration de l'acidité se fait par l'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine comme indicateur. L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) et donnée par lecture directe du volume (ml) de soude versée. Le résultat = 10xv ,1ml de NaOH correspond à 10°D et 1°D correspond à 0,1g/l d'acide lactique. (Aggad *et al.*, 2009)

Dans un bécher on introduit 10 ml de lait prélevé à la pipette, on ajoute dans le bécher deux ou trois gouttes de la solution de phénolphtaléine à 1% puis on titre par la soude d'hydroxyde de sodium (N/9) jusqu'à virage au rose, facilement perceptible par comparaison avec un témoin constitué du même lait. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

c- Pouvoir protéolytique

Le pouvoir protéolytique de la communauté ainsi que des 5 souches, a été testé selon la méthode expliquée dans le paragraphe III.7.1

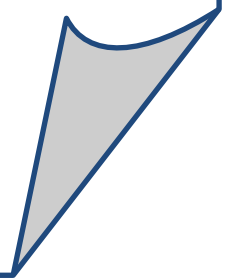
d- Pouvoir lipolytique :

Le pouvoir lipolytique de la communauté ainsi que des 5 souches, a été testé selon la méthode expliquée dans le paragraphe III.7.2

e- Production d'acétoïne

La production d'acétoïne de la communauté ainsi que des 5 souches, a été testé selon la méthode expliquée dans le paragraphe III.7.3

Résultats et Discussion



IV-Résultats et discussion :

IV.1 - Caractérisation morphologique et vérification de la pureté des souches

IV.1.1.Aspect macroscopique :

L'examen macroscopique réalisé sur milieu MRS ou M17 solide, nous a permis d'observer de petites colonies blanchâtres, de forme circulaire à contour régulier avec un diamètre qui varie entre 0.1 et 0.5 mm.



Figure 03: Observation de l'aspect macroscopique d'un isolat issu du Jben de chèvre, purifié sur milieu M17 solide.

IV.1.2 - Aspect microscopique :

L'examen microscopique nous a permis d'observer que 70 des bactéries qui présentent une forme de cocci, et qui se colorent positivement à la coloration de Gram, et qui sont immobile à l'examen de l'état frais ; alors que 5 isolats sont Gram négatif, et sont écarté de notre étude.

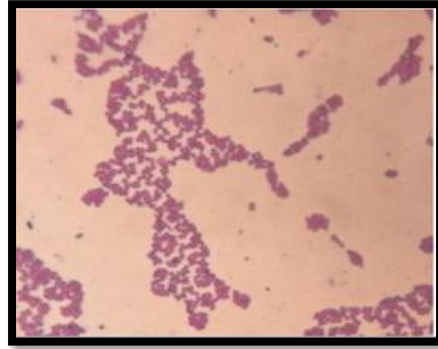


Figure 04 : Observation microscopique d'une culture pure d'un isolat de Jben de chèvre (x100)

IV.2 - Caractérisation biochimiques des souches:

IV.2.1 - Test catalase :

Pour compléter la pré identifications des 75 isolats testés, le test de catalase a été refait. Les souches étudiées sont toutes catalase négative car on n'a pas obtenu des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, ce qui est conforme aux résultats trouvés par Carr *et al.*, (2002), ce qui nous permet de présumé que les souches étudiées sont des bactéries lactiques.

IV.2.2 - Test oxydase :

Parmi les isolats testés, 68 sont oxydases négatives, et seulement 2 isolats positifs à ce test.

IV.2.3 - Test de la Nitrate réductase :

Les isolats ont subi le test de nitrate réductase dans d'un bouillon nitraté. Un résultat négatif indique que probablement on est en présence d'une bactérie lactique. Après la lecture du test, il s'est avéré qu'il y a 3 souches à nitrate réductase positive « isolats contaminants » et 65 isolats à nitrate réductase négative « isolats lactique ».

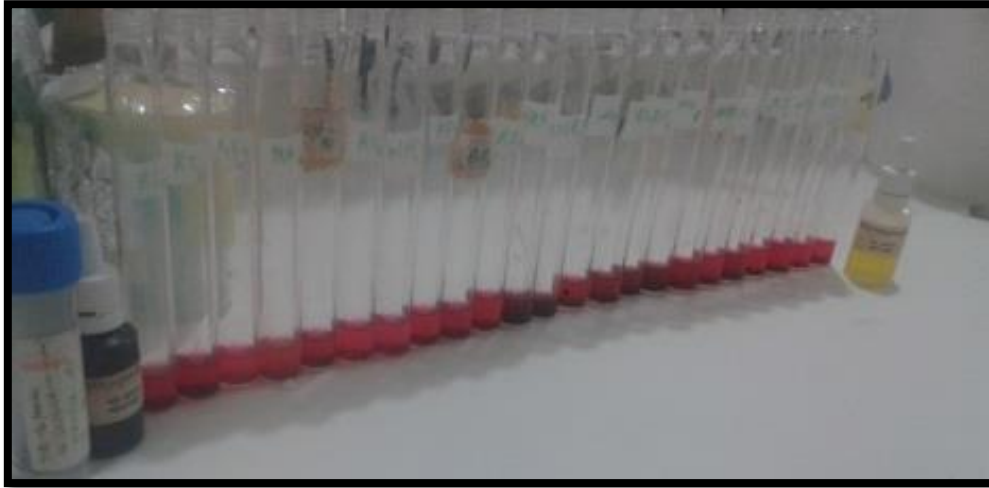


Figure 05 : Observation du résultat du test nitrate réductase après ajout de la poudre de Zinc

IV.3 - Caractérisation des aptitudes technologiques des souches lactiques

a. Activité protéolytique :

La protéolyse se traduit par l'apparition d'un halo clair due à la dégradation de la caséine autour des souchesensemencées sur le milieu PCA additionnée du lait écrémé après 24h.

d'incubation. Les résultats de l'activité protéolytique des souches sont résumés dans le tableau comme suit :

Tableau 09 : Résultats de l'activité protéolytique des isolats testés sur milieu PCA lait 2%

N°	Isolats testés	Diamètre des zones claires mm	N°	Isolats testés	Diamètre des zones claires mm	N°	Isolats testés	Diamètre des zones claires mm
1	G''1	14	23	NF3	11	45	RI8	15
2	G''3	10	24	NH'1	-	46	RI9	12
3	G'3	16	25	NH'2	10	47	RI10	13
4	G2	20	26	NH'3	10	48	RM1	-
5	H''1	20	27	NH'4	14	49	RM2	8
6	H''3	8	28	NH'8	-	50	RM4	14
7	H''7	8	29	NH'9	12	51	RM6	11
8	H5	10	30	NH'10	14	52	RM7	-
9	H'1	14	31	RF1	-	53	WOA3	9
10	H2	12	32	RF2	-	54	WOA6	6
11	ND2	14	33	RF3	-	55	WOA7	-
12	ND3	6	34	RF4	-	56	WUI5	11
13	ND4	4	35	RF5	11	57	WUI7	13
14	ND5	-	36	RF8	12	58	YOL10	12
15	ND6	14	37	RF9	12	59	Yol	12
16	ND7	-	38	RF10	14	60	YOL	11
17	ND8	6	39	RI1	12	61	YOL'	14
18	ND9	14	40	RI2	10	62	YOL1*	10
19	ND10	20	41	RI3	17	63	Yol2	12
20	NE	14	42	RI4	-	64	YOL3	10
21	NF1	18	43	RI5	-	65	YOL9	12
22	NF2	14	44	RI6	-			

- : résultat négatif, pas de protéolyse

Tableau 10: Résultats de l'activité protéolytique des isolats positifs sur milieu PCA
lait 5%

N°	Isolats testés	Diamètre des zones claires mm	N°	Isolats testés	Diamètre des zones claires mm
1	G'1	8	4	NH'4	10
2	NE	7	5	RI9	8
3	NF3	10	6	YOL2	14

- Les autres isolats sont tous négatifs pour la protéolyse sur PCA lait à 5%.
- En ce qui concerne la protéolyse sur PCA lait à 10%, tous les isolats testés sont négatifs pour cette activité

Selon vuilleumard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre comprise entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches se sont révélées protéolytiques à 2% de lait écrémé dont le diamètre des zones de protéolyse étaient 5 et 10 mm ; sauf la souches ND4; et de 7 à 14 à 5% .

L'activité protéolytique est traduite par l'apparition des halos clairs autour des colonies bactériennes. Il apparait que les souches G2 et H'1 sont fortement protéolytique comparativement aux autres. Voir le tableau 09 démontrant l'activité protéolytique des souches à 2% .Alors que les souches ND3 et ND8 sont jugées les moins protéolytique à 2% de lait écrémé avec un diamètre de 6mm. Il apparait aussi que la souche YOL2 soit la plus protéolytique à 5% de lait écrémé avec un diamètre de 14 mm.

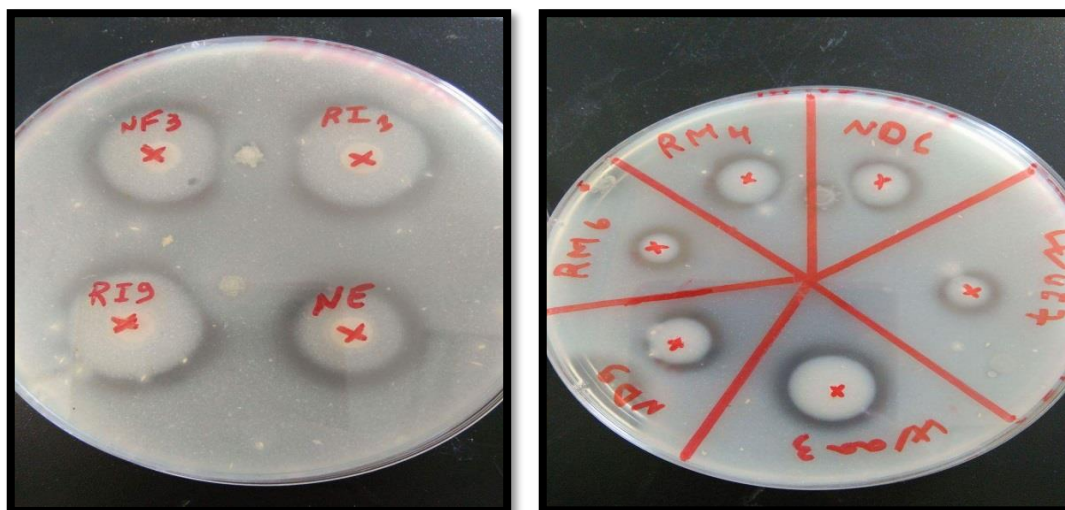


Figure 06: Observation des résultats obtenus pour l'activité protéolytique pour les isolats NF3, RI1, RI9, NE, RM4, ND6, Wua7, Woa3, ND9, RM6.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle dans la fabrication fromagère ainsi que dans le développement des propriétés organoleptique.

b.Activité lipolytique :

Tous les isolats testés ne possèdent aucune activité lipolytique.

Il apparait à travers des publication scientifiques que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaire (Lui *et al.*, 2001). Les résultats montrent que l'activité lipasique est généralement faible chez les bactéries lactiques testées sur gélose aux triglycérides.

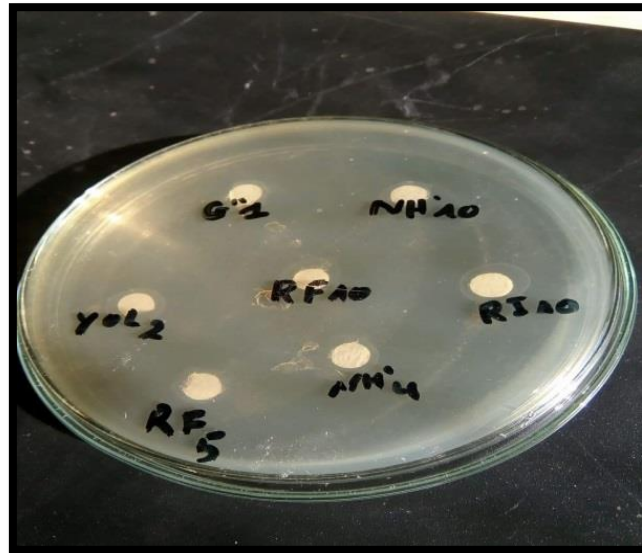
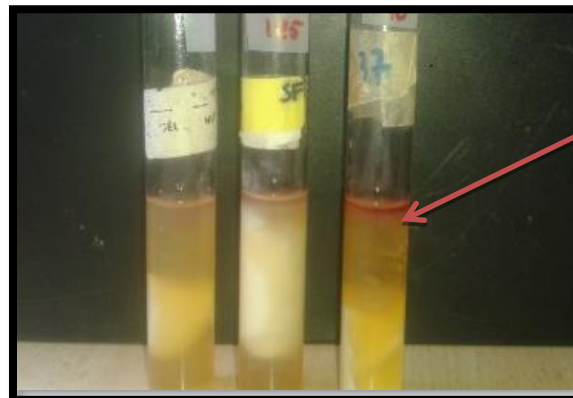


Figure 07: Observation des résultats de la lipolyse des isolats : G'1, NH'10, Yol2, RF10, RI10, RF5 et NH'4 sur milieu triglycerides.

c. Test de production de l'acétoïne :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (Cholet, 2006). Seulement 16 isolats sur les 65 testés sont positifs à ce test, c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire des composés aromatiques.



Résultat positif
« Anneau rose »

Figure 08: Observation de résultats du test de production d'acétoïne sur lait 0% pour 3 isolats.

IV.4 - Identification par MALDI-TOF :

L'analyse des spectres de masse au MALDI TOF nous a permis d'identifier 36 isolats sur les 46 testées. Une dominance du genre *Enterococcus* a été observée (24 souches), et une

absence totale des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* dans les échantillons étudiés. Avec une présence presque équivalente des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* (6 souches pour chaque genre). Cette composition n'est pas trouvée dans la bibliographie, cela est dû à la différence de méthodes de fabrication artisanal suivies dans d'autres régions (**Salmeron et al., 2002**), du type de lait utilisé (l'espèce laitière) mais aussi de l'environnement dont il est issu (**Poznanski et al., 2004**).

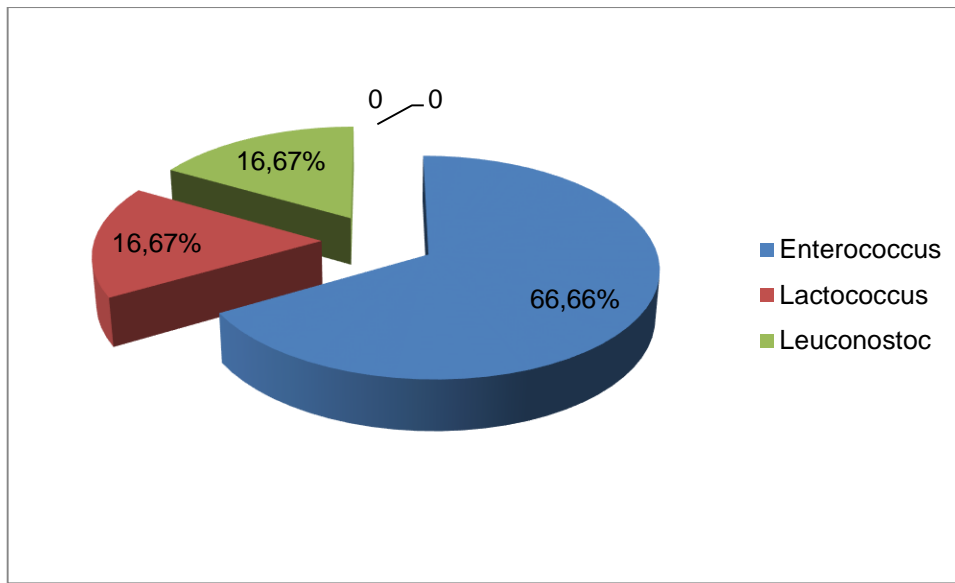


Figure 09 : Répartition des genres de la collection lactique (%)

IV.5 - Caractérisation des aptitudes technologiques de la communauté lactique :

a-Cinétique de croissance :

Les résultats de l'évolution du pH de la communauté testée ainsi que les 5 souches qui la compose sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Suivi du pH des souches et de la communauté sur bouillon M17.

Code	0h	2h	4h	6h	24h
<i>Lc ND2</i>	7.16	7.16	6.94	6.65	5.96
<i>Lc ND8</i>	7.17	7.15	7.11	5.99	5.69
<i>L ND6</i>	7.20	7.20	7.01	5.94	5.7
<i>L NF3</i>	7.25	7.25	7.06	6.52	5.70
<i>En RI9</i>	7.25	7.08	7.04	6.02	5.92
COM	7.20	7.20	7.09	5.82	5.61
Témoin -	7.20	7.19	7.17	7.16	7.10

D'après ces résultats, Il apparait que l'acidification de la communauté est la plus forte à 6h et 24h par rapport aux souches.

Tableau 12: Mesures de la Densité optique des souches et de la communauté à 600nm

Code	0h	2h	4h	6h	24h
<i>Lc ND2</i>	0.118	0.120	0.140	0.876	1.740
<i>Lc ND8</i>	0.112	0.128	0.132	0.765	1.867
<i>L ND6</i>	0.171	0.203	0.218	0.745	1.909
<i>L NF3</i>	0.141	0.162	0.188	0.385	1.681
<i>En RI9</i>	0.119	0.123	0.141	0.580	1.747
COM	0.188	0.132	0.208	0.499	1.681

On voit bien que la croissance de la communauté est moins bonne que celle des autres souches sauf NF3. Cela signifie que les souches ont eu des interactions négatives entre eux.

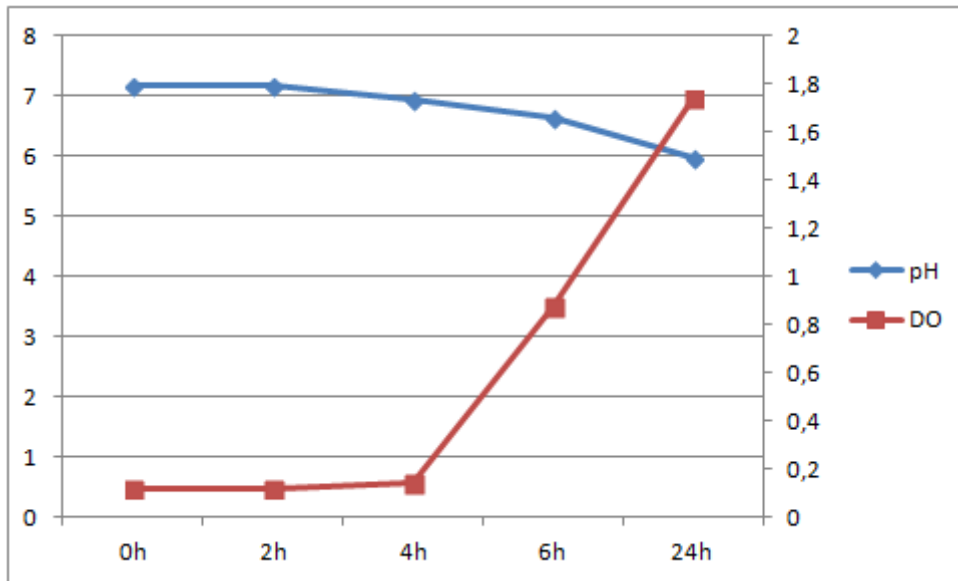


Figure 10 : Cinétique de croissance de la souche Lc ND2

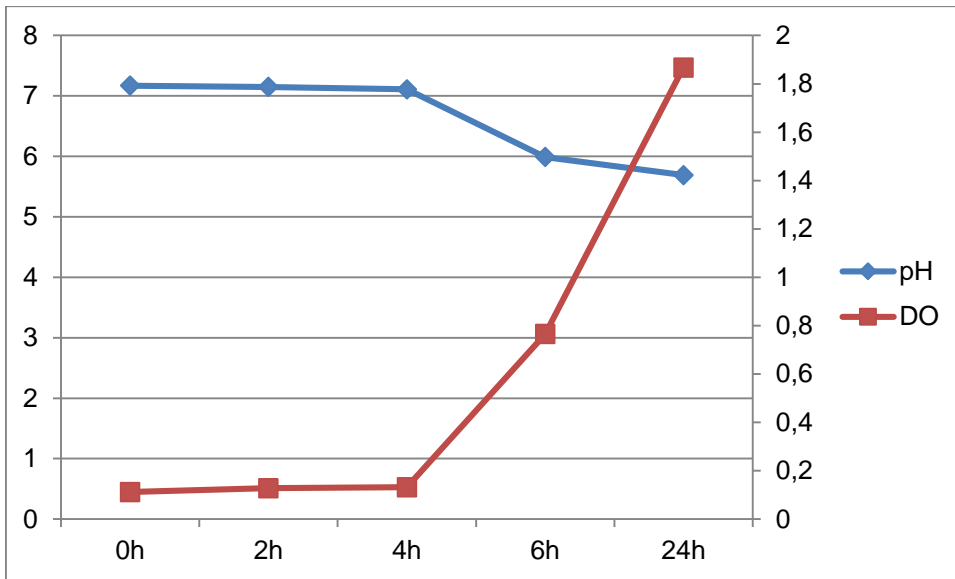


Figure 11 : Cinétique de croissance de la souche ND8

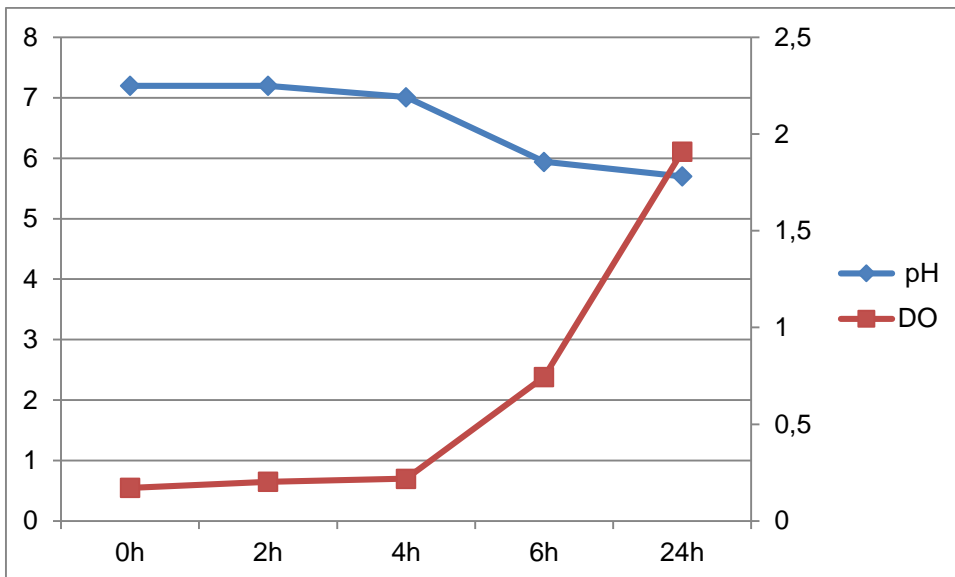


Figure 12: Cinétique de croissance de la souche ND6

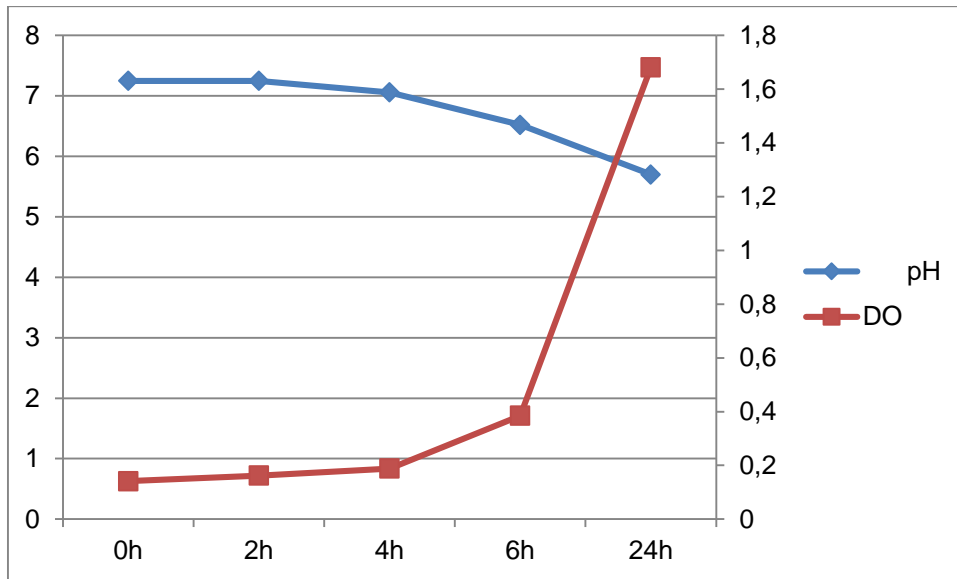


Figure 13: Cinétique de croissance de la souche NF3

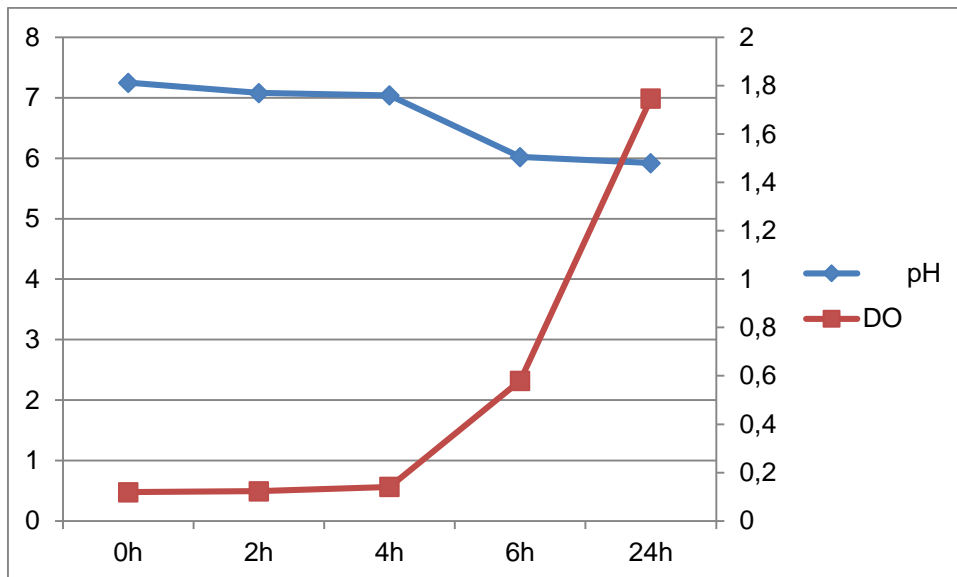


Figure 14 : Cinétique de croissance de la souche RI9

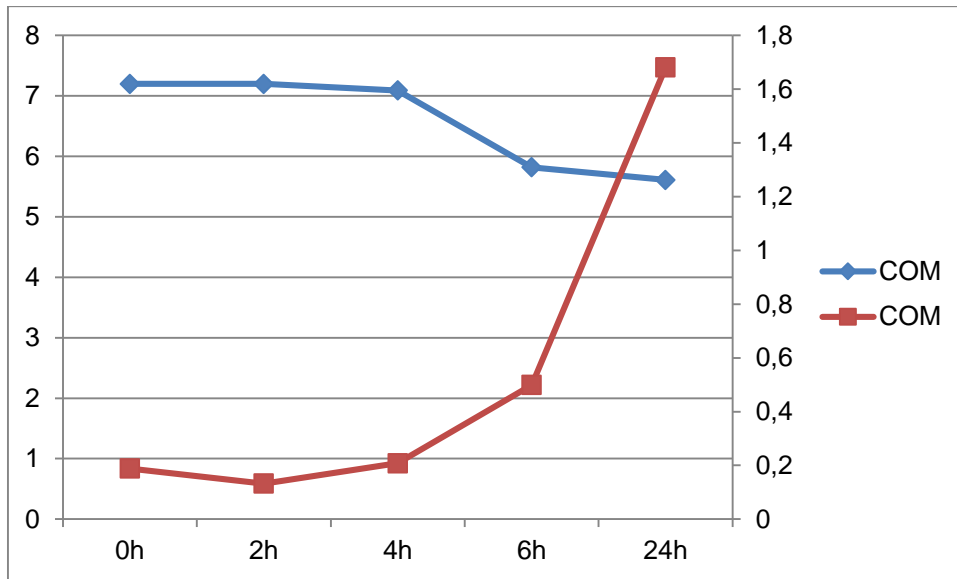


Figure 15 : Cinétique de croissance de la communauté.

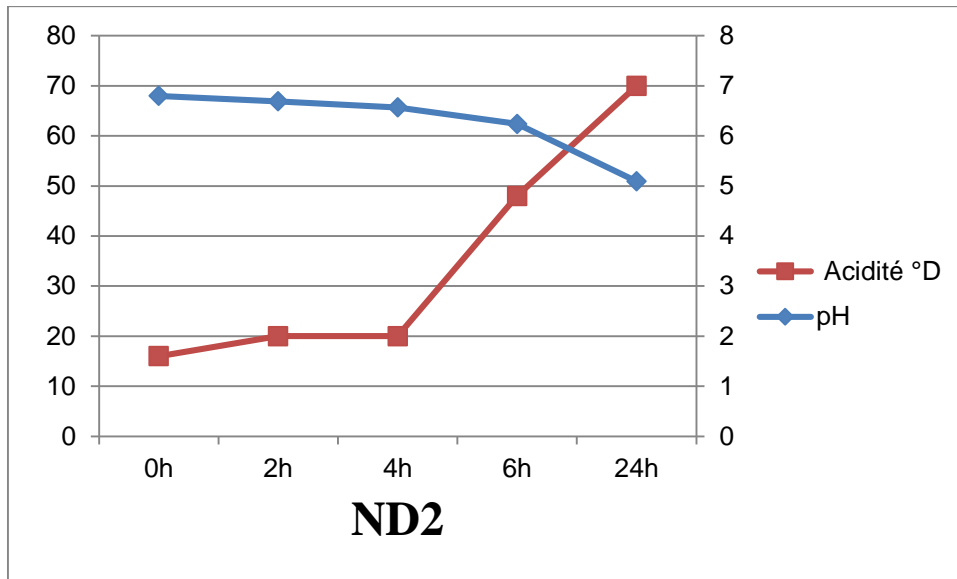
b-Cinétique d'acidification :

Les résultats de l'évolution du pH et de l'acidité titrable, de la communauté testée ainsi que les 5 souches qui la compose sont présentés comme suit :

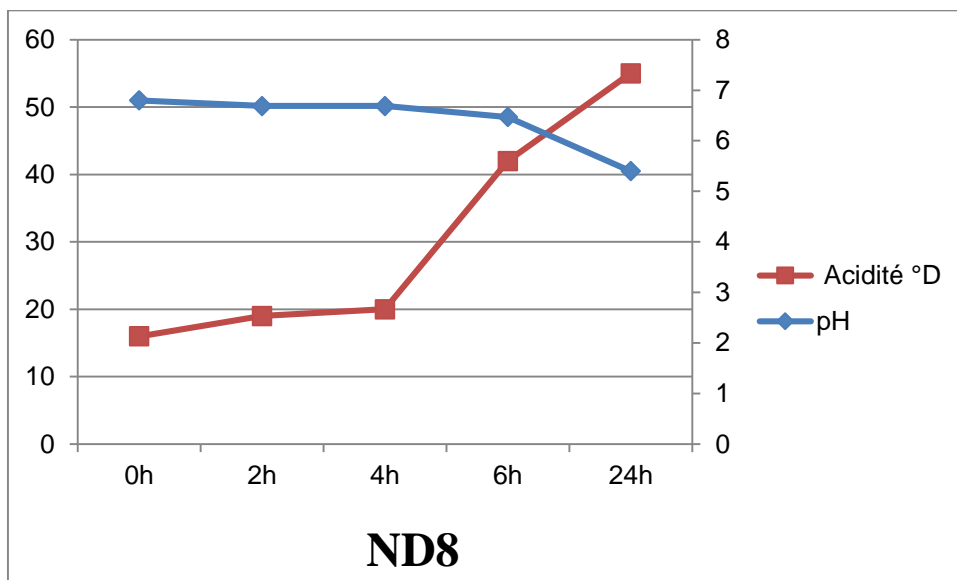
Tableau 13: Suivie du pH et de l'acidité dornic (°D) des souches et de la communauté.

Code	0h		2h		4h		6h		24h	
<i>Lc ND2</i>	6.80	16	6.69	20	6.57	20	6.24	48	5.09	70
<i>Lc ND8</i>	6.80	16	6.69	19	6.69	20	6.47	42	5.40	55
<i>L ND6</i>	6.80	16	6.69	21	6.68	21	6.35	47	5.09	69
<i>L NF3</i>	6.80	16	6.72	20	6.53	19	6.20	50	5.30	62
<i>En RI9</i>	6.80	16	6.68	19	6.57	19	6.18	50	5.30	62
COM	6.80	16	6.70	18.5	6.53	19	6.16	59	5.07	72
Témoin -	6.80	16	6.80	16	6.79	16	6.78	16	6.69	16

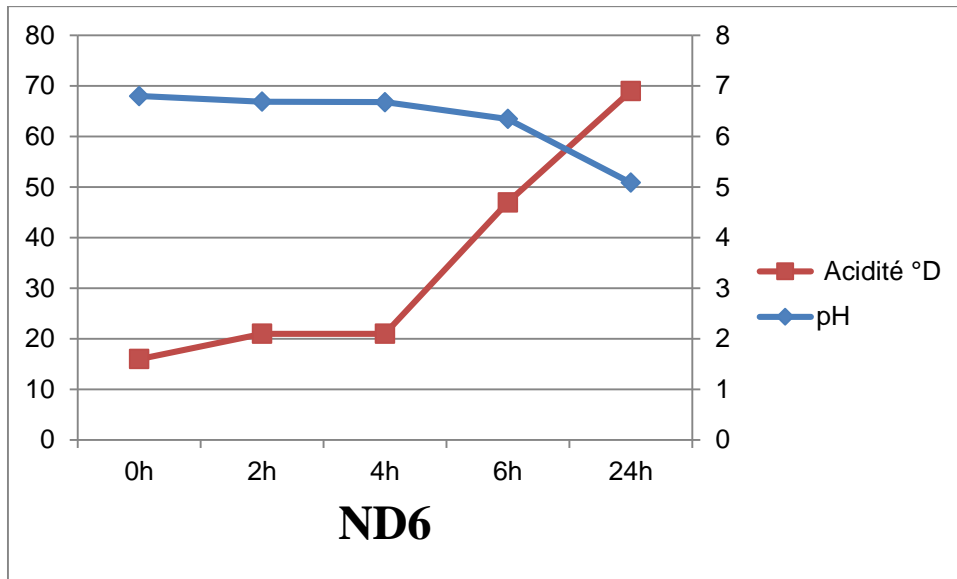
D'après ces résultats, nous remarquons la communauté a eu une forte d'acidification par rapport aux souches. Cela signifie que les souches ont eu des interactions positives entre eux.



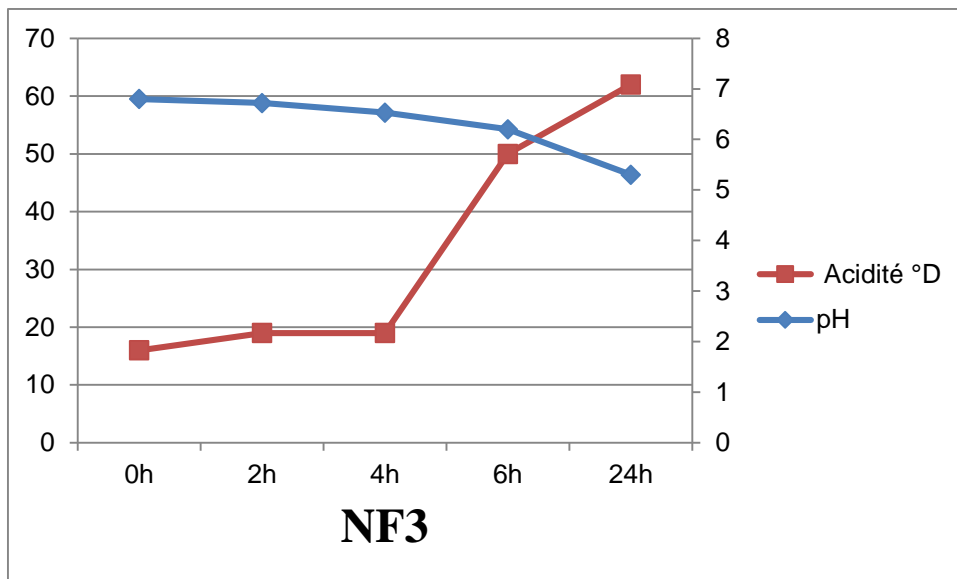
figures 16 : courbe d'acidification de la souche ND2



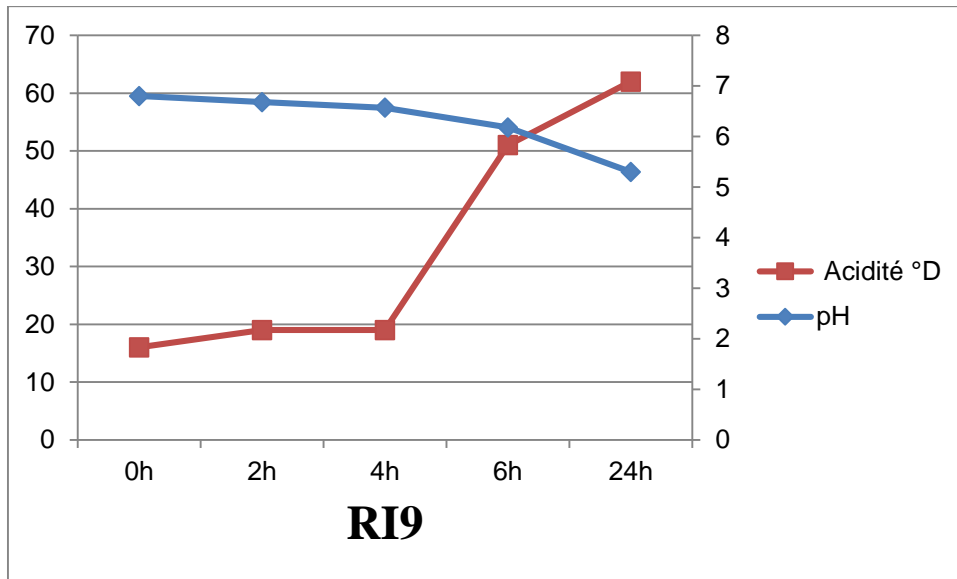
figures 17 : courbe d'acidification de la souche ND8



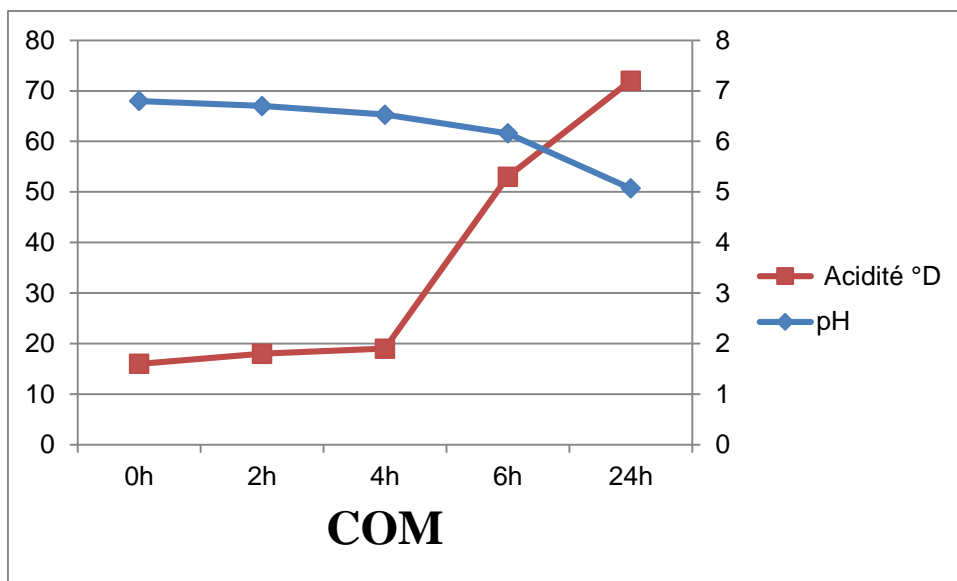
figures 18 : courbe d'acidification de la souche ND6



figures 19 : courbe d'acidification de la souche NF3



figures 20 : courbe d'acidification de la souche RI9



figures 21 : courbe d'acidification de la souche COM

D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Après 6h d'incubation nous remarquons que la vitesse d'acidification de la communauté est un peu plus élevée que celle des souches seules.

d- Autres aptitudes technologiques :



Figure 14: Observation des résultats obtenus pour l'activité protéolytique de la communauté.

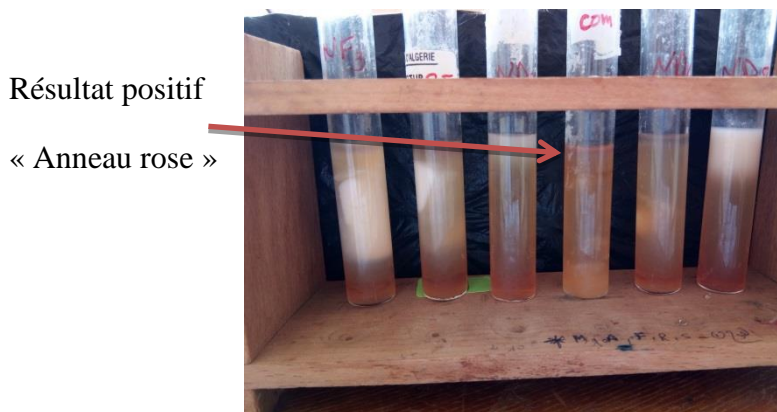
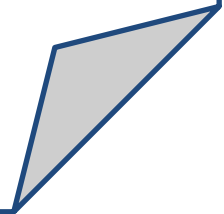


Figure 15: Observation des résultats du test de production d'acétoïne sur lait 0% pour la communauté.

Ces résultats permettent de diduire que la communauté a conservé sa capacité à produire de l'acétoïne mais par contre il y a eu une inhibition de son pouvoir protéolytique ;donc elle peut uniquement être utilisé pour un fromage frais.

Conclusion



Conclusion

Le lait est l'aliment essentiel pour tous les mammifères à cause de sa richesse en matières nutritionnelles, pour la prolongation de sa conservation le lait est utilisé sous d'autres formes (L'ben, Raib, Yoghourt, Fromage...etc.).

J'ben est l'un de ces produits, préparé à l'artisanat ou bien traditionnellement à partir de lait cru de vache, de chèvre ou bien de brebis, parfois utilisé à l'état frais, parfois on l'ajoute du sel, de l'ail, du persil...etc. soit pour améliorer le goût soit pour la conservation.

Cette étude a permis d'identifier des souches de bactéries lactiques à partir du J'ben de chèvre afin d'étudier leurs caractères technologiques.

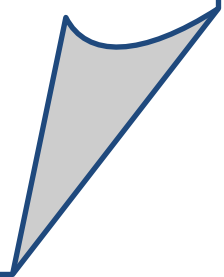
L'isolement des bactéries lactiques sur le milieu MRS et M17 a permis d'étudier les caractères physiologiques et biochimiques de 75 souches dont l'ensemble fait partie des genres: *Entérocooccus* qui est le genre le plus dominant, et *Leuconostoc*, et *Lactococcus*.

Ces bactéries qui peuvent être appliquées à la technologie laitière à cause de leurs pouvoirs technologiques (acidifiant, dégradation des protéines, la production de substances aromatiques)

Ces observations ouvrent des Perspectives futures:

- Etude de l'aptitude technologique de nos isolats (Protéolyse, lipolyse).
- Etude de cinétique de croissance et d'acidification.
- Identification moléculaire des isolats.

Références Bibliographiques



Références bibliographiques

- **Abdelaziz S. et Ait Kaci F.**, 1992. Contribution à l'étude physico-chimique et Microbiologique d'un fromage traditionnel algérien fabriqué à partir du lait de chèvre le "Djben". Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Institut national agronomique d'El Harrach, Alger. 67 p.
- **Abdessalam A. D.**(1984).Contribution à l'étude du lait des ceintures laitières ériurbaines de la zone cotonnière du Sénégal. Th. Méd. Vét., Dakar, *IQ95*, n021, 126p.**Aggad et al., 2009**
- **Aissaoui Zitoun O., Zidoune M.N.**, 2006. Le fromage traditionnel algérien "bouhezza".Séminaire d'Animation Régional. ' Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments ',INSAT – Tunis (communication orale), Tunisie /27 – 28 – 29 novembre Actes des sommaires. Pp 118 à 124.
- **Aissaoui Zitoun O.**, 2003. Fabrication et caractéristiques d'un fromage traditionnel algérien *bouhezza*. Thèse de magister, INATAA, Constantine, Algérie. 138 p.
- **Ammor, M.S., Floréz, A.B. et Mayo, B. (2007)**.Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria.*Food Microbiol.***24**:559-570.
- **Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004)**. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*,**3** : 72–78.
- **Badis A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R. (2006)**. Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.
- **Badis, A., Guetarnib, D., Moussa Boudjemaa, B., Hennic, D.E., Kihalc, M.,2004b**. Identification and technological properties oflactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, **21**:579–588
- **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R. (2005)**.Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.

- **Benkerroum, N. and Tamime, A.Y. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21: 399–314.
- **Boubekri, K., et Ohta, Y.,1996.** Antimutagenicity of lactic acid bacteria from El-Klila Cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 397-402.
- **Bourgeois, C.M., Larpent, J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. pp.704. Tome 1. 2e Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- **Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. et Zuca, J. (1996).** Lait et les produits laitiers non fermentés, Microbiologie alimentaires. Tome 1, aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité des aliments.
- **Carmen, M., Jan Kok, E.H., Pelaez, C., Requena, T. et Buist, G. (2000).** Applied and Environmental Microbiology, Aug., Pp: 3174-3179.
- **Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol*, 28 : (4) 281-370.
- **CISSE S. A. 1997-** Contribution à l'étude de la pasteurisation du lait: faisabilité technique et contrôle de la qualité dans la région de Kolda.
- **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.* (75) : 595-603
- **Desmazeaud M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.
- **Desmazeaud M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.

- **EL-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., EL-mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertle, T. (2011).**Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Food Sci.Technol.* 22:509-516.
- **Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- **Hallal A., 2001.** Fromages traditionnels algérien. Quel avenir ? Revue agroligne n° 14, Avril-Mai.
- **Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R. (2007).** Isolation and identification of lacticacid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.*134-142.
- **Lahsaoui, S. 2009.** Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (klila).Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur Université El Hadj Lakhdar Batna, Département d'Agronomie.
- **Larpent, J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. Lavoisier – Tec & Doc, Paris.
- **Larpent, J.P, (1997).** Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages.
- **Leroy, F., et De Vuyst, L.(2004).**Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the foodfermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15: 67-78.
- **Leveau, J.Y. et Bouix, M. (1993).** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. pp : 2-39.Eds.Tech. et Doc, Lavoisier, Paris.
- **Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.
- **Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.

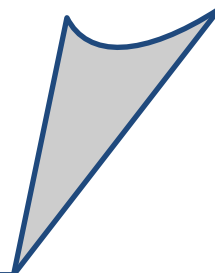
- **Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Marshall V.M., Rawson H.L.1999.** Effects of exopolysaccharides-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International journal of food science and technology* 34: 137-143.
- **Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., Elyachioui, M. 2007.** Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2, 23–27.
- **Swings, J. (2009).** Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'Jben'. *J. Appl. Microbiol.* **106** : 486–495.
- **Ouadghiri, M., Mohamed, A., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251:267–271.
- **Ouadghiri M., (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V–agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc. 132 p.
- **Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E.K. (2012).** “Green Preservatives”: combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*. 217.
- **Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. pp.1-106. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
- **Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F. and Coconcelli, P. S. (2004).** Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol*, 92: 141–151.
- **Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., Tailliez, P., and Gruss, A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol*. 152: 131-139.
- **Randazzo, C.L., Caggia, C. Et Neviani, C.L.E. (2009) .** Application of molecular

approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, 78:p 1–9

- **Sakili D ; Issoual D.2003.** lactic acid bacteria in processing maroccan smen. Copyright academic d'agriculture de France. Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Errachidia ,Maroc
- **Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. and Barron, L.J.R. (2002).** effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiol*, 19: 167-174.
- **Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. and Barron, L.J.R. (2002).** effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiol*, 19: 167-174.
- **Singleton, P. (1999).**Bactériologie.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
- **Stiles, M.E. et Holzappel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.*Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- **Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Keresters, K. et Swwings, J.(1996).** Polyphasictaxonomy, a consensus approach to bacterial systematic.*Microbiol. Rev.* 60: 407.
- **Vuillemard J.C, 1986,** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 3 : 1-65
- **Welman A.D., Maddox I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, vol.21, p. 269-274
- **Walstra P., Geurts T.J.,Noomen A.,Jellema A., Van Boekel M.A.J.S.1999.** Dairy technology, principales of milk propreties and processes. Food science and technology. New York-Basel: Marcel Dekker Inc, p. 325-515.
- **Yateem, A., Balbam, T., Al-Surrayai, T, T, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008).**Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk.*Int. J. Dairy Sci.* 3:194-199.

- **Zaidi O., 2002.** Caractérisation du fromage traditionnel *bouhezza*; caractérisation physicochimique et microbiologique. Mémoire d'ingénieur INATAA. Constantine, Algérie. 51 p

Annexes



Annexes :

Annexe 1 :

Composition des milieux de culture (g/l)

- Milieux solides

1/ Milieu MRS :

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1,0ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
Agar	15g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

pH=6.5±0.2 à 37°C ; Autoclavage : 121°C /15min

2/ Milieu M17 :

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Peptone de caséine	2,5g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de soja	5g
Acide ascorbique	0,5g
B-glycérophosphate de sodium	19g
Agar	15g
Sulfate de magnésium	0.25g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

pH=7.1±0.2 à 37 °C ; Autoclavage : 121°C pendant 15min

3/ Milieu PCA-lait : (pH=7,2)

Tryptone..... 5g
Extrait de levure2,5g
Glucose1g
Poudre de lait écrémé (0%).....1g
Agar15g
Eau distillée q.s.p 1000 ml
Autoclavage : 115°C pendant 20min

4/ Milieu aux triglycérides : (pH=6,5)

Peptone 5g
Extrait de levure3g
Triglycérides.....10ml
Agar15g
Eau distillée q.s.p 1000 ml
Autoclavage : 110°C pendant 15min

Annexe 2 :

Composition des diluants (g/l)

Eau physiologique peptonée

Peptone 0,5g

Chlorure de sodium 8,5g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7,0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Eau physiologique 9 /ml

NaCl 9g

Eau distillée 1000 ml

Annexe 3 : Les étapes de coloration de Gram

Les étapes de coloration de Gram

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

- Sur une lame, prélever à l'aide d'une anse un peu d'une colonie bactérienne et l'étaler avec une goutte d'eau distillée stérile;
- Recouvrir la lame avec la solution *violet de gentiane* pendant une minute;
- Ajouter du *Lugol* pendant 30 seconde ;
- Décolorer avec de l'alcool 95% ; puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fushine et laisser agir 20 à 30 seconde ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique avec huile d'immersion (× 100)

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

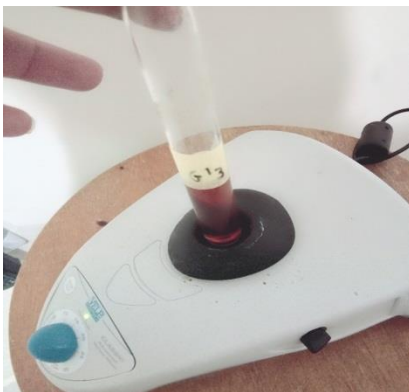
Annexe 4 : liste de matériels utilisés



autoclave



étuve



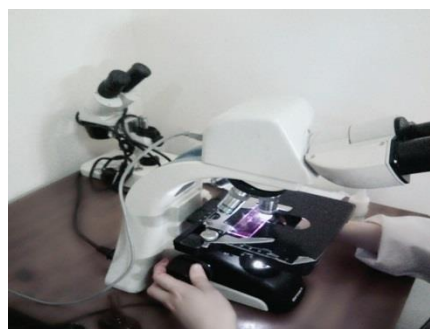
Vortex



pH mètre



Plaque chauffante



microscope optique