

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 و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

HAMAR Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

POTENTIALITE TECHNOLOGIQUE DES LACTOCOQUES ISOLEES DU LAIT CRU DE CHEVRE

Soutenu publiquement le 02/07/2018

DEVANT LE JURY

Président	BAHRI Fouad	Professeure à U. Mostaganem
Encadreur	BEKADA Ahmed	Professeure à Centre Universitaire de Tissemsilet
Examinatrice	HOUBAD Khadidja	Doctorante à U. Mostaganem
Examinatrice	ADJOU DJ Fatma	maitre assistant à U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire de Microbiologie

Dédicaces

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi

mon père...

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon coeur, ma vie et mon bonheur ; **maman** que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à ma sœurs **NABILA**, son mari **DJELLOUL** et leurs petites enfants **AYA**, **MOUHAMED** et **ALAA** ; et ma cher sœur **SOUAD**.

je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude,

et frères de coeur, toi **SOUFYANE**, **SAMIA** et **ASMAA**.

HANANE

Remerciements

On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Au terme de ce travail, il est agréable de présenter nos remerciements les plus sincères à **Mr BEKADA .A** pour avoir accepté de nous encadrer et orienter tout au long de notre travail.

Nos vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Nous remercions **Mr BAHRI Fouad** qui a accepté de présider ce jury dont je lui exprime notre haute considération.

Nos sincères remerciements vont à **Melle ADJOU DJ Fatma** et **Melle HOUBAD Kadidja**, d'avoir accepté d'examiner ce travail et on lui exprime nos profonde reconnaissance pour son aide précieuse.

Nos remerciement s'adresse également à tout nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ADH : production de l'arginine dihydrolase.

ESC : hydrolyse de l'esculine.

ACT : production d'acetoïne.

CTR : dégradation de citrate.

BEA: gélose Bile Esculine Azide

MSE: gélose de Mayeux, Sandine et Elliker

RES : thermorésistance à 60,5 °C pendant 30 min.

Lc. : *Lactococcus*

T: triméthoprim

UFC : Unité Formant Colonie

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

pH : Potentiel d'Hydrogène

Liste des figures

Figure 01 : <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> sous forme de cellules ovoïdes par paire et en chaînette selon la souche	22
Figure 02 : Métabolisme du glucose, du lactose et du citrate par <i>Lc. lactis</i> en amont du pyruvate	25
Figure 03 : Distribution des atomes de carbone dans les métabolites dérivés du pyruvate chez <i>Lc. Lactis</i>	25
Figure 04 : Cycle du TCA et lutte contre l'acidification du cytoplasme.....	26
Figure 05 : Représentation schématique du mécanisme de réduction du lait par <i>Lc. Lactis</i> ...	27
Figure 06 : Représentation schématique du métabolisme de l'arginine chez <i>Lactococcus lactis</i>	28
Figure 07: Position phylogénétique de la sous-espèce <i>tractae</i> au sein des espèces de lactocoques d'après les séquences codant le 16S Rdna.....	29
Figure 08: Représentation schématique d'isolement et de purification des lactocoques	35
Figure 09: Schéma représentant le mini préparation le test de la fermentation des sucres...	38
Figure 10: instruments pour la mesure de l'acidité titrable	42
Figure 11 : Représentation schématique du différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification.....	43
Figure 12 : Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.....	44
Figure 13 : Isolement de <i>Lactococcus</i> sur milieu Elliker	45
Figure 14 : Purification de <i>Lactococcus</i> sur milieu Elliker	46
Figure 15: Aspect microscopique de <i>Lactococcus</i>	47
Figure 16. Résultat de type fermentaire des isolats.....	48
Figure 17. Test de réduction de citrate sur milieu KMK.....	49
Figure 18. Résultats du test de sucre des isolats.....	49
Figure 19: Résultats de test Sherman à 1% et 3% (Lactocoques)	51
Figure 20. Résultat de la dégradation de l'esculine sur BEA.....	51
Figure 21. La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).....	52

Figure 22 . Résultat du test de croissance à 10°C	53
Figure 23. Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (4% NaCl).....	53
Figure 24. Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6	54
Figure 25. Résultat de La croissance des isolats sur milieu Elliker pH 4	54
Figure 26: diagramme du pourcentage des principaux espere de lactococcus isolées à partir de lait de chèvre.	56
Figure 27: Test de la production d'acétoïne.....	56
figure 28: résultats de l'activité protéolytique	57
figure 29: résultats de l'activité lipolytique sur milieu agar au l'huile d'olive) et au tween80.	58
Figure 30 : Aspect des colonies sur milieu MSE.....	59
Figure31: résultat de l'activité antibactérienne de genre lactococcus vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas</i>	61
Figure 32: Les cinétiques d'acidifications, l'évolution de l'acidité titrable et l'évolution de des souches dans lait écrémé.....	62
Figure33: L'évolution de la biomasse sur milieu Elliker lactosé des souches dans le lait écrémé.....	63

Liste des tableaux

Tableau 01: caractéristique organoleptique de lait de chèvre.....	04
Tableau 02: Teneur en matière grasse (g / 100 mL) et lipolyse (μeq d'acides gras libres / ml) de lait écrémé.....	06
Tableau 03 : flore indigène de lait cru.....	06
Tableau 04: Composition chimique et qualité microbiologique du lait de chèvre cru entier.....	07
Tableau 05: Composition chimique et qualité microbiologique du lait de chèvre pasteurisé écrémé.....	08
Tableau 06: La composition brute moyenne du lait de chèvre produit à partir de différentes races dans différents pays.....	10
Tableau 07: Les différents genres de bactéries lactiques.....	15
Tableau 08 : Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des exploitations agricoles.....	23
Tableau 09 : Lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers	23
Tableau 10 : Différences phénotypiques entre <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> . <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> n'existe plus (= actuellement <i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>).....	29
Tableau 11: Tableau récapitulatif des résultats du test de la réductase et de pH.....	45
Tableau 12: Profile fermentaires des isolats du genre présumé <i>Lactococcus</i> sp.....	50
Tableau 13: Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre présumées <i>Lactococcus</i> isolées du lait cru de chèvre	55
Tableau 14: l'Activité protéolytique et lipolytique	58
Tableau 15 : production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques	59
Tableau 16: Résultat de l'activité antibactérienne des souches de <i>Lactococcus vis-à-vis</i> <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas</i>	60
Tableau 17: résultats des taux de croissance des souches étudiées.....	63

Résumé

Notre projet de recherche repose sur deux volets le premier est les lactocoques ont été isolées à partir de lait cru de chèvre, identifiées et caractérisées par des propriétés phénotypiques, physiologiques et biochimiques, en ce qui concerne le deuxième volet est sur l'exploitation des potentialités technologiques, l'étude à portée le pouvoir aromatisant, l'étude des cinétiques des souches (C4, C10, C16), l'activité protéolytique, lipolytique, l'activité exopolysaccharide et étude de l'activité antibactérienne de genre *Lactococcus* (méthode de double couche)

Les résultats ont montré que des principales espèces de *Lactococcus* isolées à partir de lait de chèvre sont *Lactococcus lactis subsp. lactis* 37%, *Lactococcus plantarum* 19%, *Lactococcus lactis subsp. lactisbiovar. Diacetylactis* 19%, *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* 12%, *Lactococcus reffinolactis* 13%, et aussi indiquent que l'ensemble des souches présentent un bon pouvoir acidifiant, protéolytique, lipolytique, exopolysaccharide, aromatisant, et les aptitudes probiotiques (tolérance à l'acidité et un pouvoir antimicrobien) sont aussi révélées intéressantes

Mots-clés: lait de chèvre, bactéries lactiques, *Lactococcus*, potentialité technologique

summary

Our research project is based on two components the first is the *Lactococcus* were isolated from raw milk of goat, identified and characterized by phenotypic properties, physiological and biochemical, as regards the second part is about the exploitation of potential technological study to reach the flavoring activity, Study of the kinetics of strains (C4, C10, C16), activity proteolytic, lipolytic, activity exopolysaccharide and study of the antibacterial activity of *Lactococcus* kind (method of double layer)

The results showed that major species *Lactococcus* isolated from goat milk are *Lactococcus lactis subsp. lactis* 37%, *Lactococcus plantarum* 19%, *Lactococcus lactis subsp. lactisbiovar. Diacetylactis* 19%, *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* 12%, *Lactococcus reffinolactis* 13%. and also indicate that the sets of strains have a good power acidifying, proteolytic, lipolytic, exopolysaccharide, flavoring, and probiotics skills (tolerance to acidity and antimicrobial power) have also proved interesting

Keywords: milk goat, lactic acid bacteria, *Lactococcus*, technological potentiality

ملخص

يعتمد مشروعنا البحثي على مكونين: الأول هو عزل *Lactococcus* من حليب الماعز الخام، التي يتم تحديدها وتمييزها بخصائص المظهرية، الفيزيولوجية والكيميائية، فيما يتعلق بالجزء الثاني هو دراسة الإمكانيات التكنولوجية للوصول إلى النشاط الملائم، فإن الدراسة تصل إلى قوة النكهة، دراسة حركية السلالات (C4، C10، C16)، البروتينية، النشاط الدهني، نشاط السكر غير الشرعي ودراسة النشاط المضاد للبكتيريا من جنس *Lactococcus*

أظهرت النتائج أن النوع الرئيسي من *Lactococcus* المعزول من حليب الماعز هو

Lactococcus lactis subsp. lactis 37%, *Lactococcus plantarum* 19%, *Lactococcus lactis subsp. lactisbiovar. Diacetylactis* 19%, *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* 12%, *Lactococcus reffinolactis* 13%

وتشير كذلك إلى أن مجموعة السلالات ذات الحمض الجيد، والبروتين، والدهون، و exopolysaccharide، والنكهة، والقدرات الحيوية (التسامح مع الحموضة و مضاد الميكروبات) مثيرة أيضا للاهتمام.

الكلمات المفتاحية: حليب الماعز، بكتيريا حمض اللاكتيك، *Lactococcus*، الإمكانيات التكنولوجية

Table des matières

Remerciments	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
INTRODUCTION.....	01
 PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
 Chapitre I: Lait de chèvre.....	 03
 1. Généralités sur le lait de chèvre.....	 03
1.1. Définition légal du lait de chèvre.....	03
1.2. Importance du lait de chèvre.....	03
2. Caractéristique du lait de chèvre.....	04
2.1. Les Caractéristique organoleptiques.....	04
2.2. Caractéristiques physiques et (bio) chimiques.....	04
2.3. Caractérisation microbiologique de la chèvre Lait.....	06
2.3.1. Flore indigène ou originelle	06
2.3.2 Flore Contaminant.....	07
3. Des races laitières sélectionnée.....	08
3.1. Quelques élément d’histoire de la chèvre.....	08
3.2. Les races africains.....	08
3.3. Les races européenne.....	09
3.4. Les races asien.....	09
3.5. Les reste race du monde.....	09
4. Influence quelques facteurs sur la composition et la propriétés du lait de chèvre.....	10
4.1. Influence de la race.....	10
4.2. Stade de lactation.....	11
4.3. L’alimentation.....	11
 Chapitre II: Les bactéries lactiques.....	 12
1-Historique.....	12
2-Définition.....	12
3-Habitat	12
4-Caractéristique générales des bactéries lactiques.....	13
5-Classification des bactéries lactiques.....	14
5.1. Critères de la classification	14
5.2. Principaux genres des bactéries lactique	15
6.Domains d’utilisation des bactéries lactiques	17

6.1. Dans le domaine de l'agriculture	17
6.2. Dans le domaine de la sante	18
6.3. Dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire	18
7. notion des probiotiques	19
7.1. définition	19
7.2. rôle des probiotiques	19
7.3. applications des probiotiques	19
Chapitre III: Genre Lactococcus	21
1.Définition légal du genre Lactococcus	21
2.Morphologie	21
3.Habitat et rôle	22
4. Caractéristiques physiologiques et métaboliques.....	24
5. Taxonomie	28
6. Isolement et identification	29
7. Intérêt technoloquoque	30
7.1 Production d'acide lactique	31
7.2 Production d'arome	31
7.3 Production de polysaccharides	31
7.4Activité protéolytique	31
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	
I.Matériel	32
I.1 Milieux de culture	32
• <i>Géloses</i>	32
• <i>Bouillons</i>	32
I.2.Produits chimiques et réactifs	32
• Colorants	32
• Les réactifs	32
• sucres	32
I.3 Appareillage	32
I.3.1 Appareillage utilisée pour le test physico-chimique	32
I.3.2 Appareils utilisés pour les manipulations microbiologiques	32
• Petits matériels et verreries	33
II.Méthodes analytiques	34
II.1. Echantillonnage et prélevement « matériel biologique	34
II.2. tests préliminaire	34
II.2.1.test du pH	34
II.2.2. Test de la réductase	34
II.3. Analyse pri-identification	34
II.3.1 Préparation des délutions décimales	34
II.3.2 Isolement des bactéries lactiques	34
II.3.3 Purification des isolats	35
II.4. Identification des souches	36
II.4.1. caractérisation phénotypique des isolats	36
II.4.1.1 caractères morphologiques	36

• Étude macroscopique	36
• Étude microscopique	36
• Coloration de Gram	36
II.4.1.2. Caractères physiologiques et biochimiques	37
II.4.1.2.1 Caractères biochimiques	37
▪ Test de catalase	37
▪ Type fermentaire	37
▪ Utilisation du citrate	37
▪ Utilisation des sucres	38
▪ Test de bleu de Sherman	38
▪ L'hydrolyse de l'esculine	39
▪ Hydrolyse de l'arginine	39
II.4.1.2.2 Caractères physiologiques	39
▪ Test de croissance à différentes température et de thermorésistance	39
▪ Test du Na Cl et du pH	40
II.5. Caractère biotechnologie	40
▪ Test de production d'acétoïne	40
▪ Etude de l'activité protéolytique	40
▪ Etude de l'activité lipolytique	41
▪ Etude de l'activité exopolysaccharide	41
▪ Etude de l'activité antibactérienne de genre lactococcus (méthode de double couche)	41
▪ Etude des cinétiques des souches	41
II.6 Conservation des souches	44
6-1-Conservation courte durée	44
6-2-Conservation longue durée	44
PARTIE III : RESULTAT ET INTERPRETATIONS	
1.Test du reductase et du pH.....	45
2.Isolement et purification des souches	45
3.Identification des souches	46
3.1. caractérisation phénotypique des isolats	46
3.1.1.caractères morphologiques	46
• étude macroscopique	47
• étude microscopique	47
3.2 caractères physiologiques et biochimiques	48
3.2.1.caractères biochimiques	48
▪ test de catalase	48
▪ type fermentaire	48
▪ utilisation du citrate	49
▪ utilisation des sucres.....	49
▪ test de bleu de sherman	51
▪ l'hydrolyse de l'esculine	51
▪ hydrolyse de l'arginine	52
3.2.2 caractères physiologiques	52
▪ test de croissance à différentes température et de thermorésistance	52

▪ test du na cl et du ph	53
4. caractère biotechnologie	56
▪ test de production d'acétoïne	56
▪ étude de l'activité protéolytique	57
▪ étude de l'activité lipolytique	57
▪ étude de l'activité exopolysaccharide	58
▪ étude de l'activité antibactérienne de genre lactococcus (méthode de double couche)	60
▪ étude des cinétiques des souches (C4, C10 ,C16)	61
A. Pouvoir acidifiant	61
B. Evolution de la biomasse.....	62
DISCUSSION GENERALE	64
CONCLUSION	69
BIBLIOGRAPHIE	70
ANNEXES	

INTRODUCTION

Le lait de chèvre, dont la production commence à se développer en Algérie ces dernières années, présente un bon nombre d'avantages lui permettant même de substituer le lait de vache ; Il est connu depuis fort longtemps que le lait de chèvre en Algérie est principalement consommé par les éleveurs et que sa valorisation industrielle reste souvent très restreinte, voire inexistante. Malgré l'essor connu par la filière laitière ces dernières années, le lait de chèvre autoconsommé par les éleveurs, reste très peu destiné à une transformation technologique. Il ne manque pourtant pas d'atouts et de qualités comme l'attestent les recherches scientifiques qui mettent en évidence ses propriétés diététiques (**Boumendjel et al.;2017**).

Plusieurs microorganismes (bactéries, levures et moisissures) sont présents dans le lait de chèvre formant ainsi un écosystème microbien complexe. Les bactéries peuvent être naturellement présentes dans le lait ou bien accidentellement par manipulation (**Hennane,2011**).

L'isolement des bactéries lactiques à partir de lait de chèvre correspond à un sujet intéressant car peu d'information sont disponibles dans la littérature sur les microorganismes, ayant une importance technologique(**Kihal M. ;2005**).

L'utilisation de souches lactiques, à l'échelle industrielle, nécessite une sélection sur base des propriétés technologiques, physiologiques et biochimiques, ainsi que la mise en oeuvre de procédés biotechnologiques bien maîtrisés pour leur production et leur conservation (**Ibourahema.,2010**).

Parmi les groupes lactiques importants, se révèlent les *Lactocoques* qui sont d'une grande importance à l'échelle industrielle et sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme souches «starter». Les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits(Salminen et *al.*, 2004).

L'objectif recherché à travers cette étude consiste à isoler à partir du lait cru de chèvre des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactococcus* tout en procédant à leur purification et leur identification, suivie l'étude de leur aptitudes technologiques «Etudier la production des composés aromatiques acétoine-diacétyl, Etudier les cinétiques de croissance et d'acidification des souches dans le milieu lait et études de l'activité protéolytique, lipolytique, exopolysaccharide et l'activité antibactérienne de genre lactococcus »

Notre manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre sur la Généralité sur le lait de chèvre, le deuxième chapitre donne une présentation sur les bactéries lactiques et la dernière chapitre pour le Genre *Lactococcus* en générale, leur Caractéristiques physiologiques et métaboliques et leur Intérêt technologique

Dans la seconde partie du manuscrit nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Elle comporte la caractérisation physicochimique et microbiologique du lait cru de chèvre ainsi que les techniques d'identification des souches lactiques isolées et purifiées et l'étude de leurs propriétés technologiques. La dernière partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le lait de chèvre :

1.1. Définition légal du lait de chèvre :

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre selon la teneur en α -carotène de sa matière grasse, d'une saveur douceâtre et d'un pH légèrement acide (6,6 à 6,8), proche de la neutralité (ALAIS, 1984).

Le lait est considéré comme un humain presque complet la nourriture et il est considéré comme le premier aliment pour le nouveau né de la progéniture, Le lait de chèvre a des propriétés bénéfiques pour la santé. (Dhartiben et al.,2016).

Le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache à cause de l'absence de β -carotène, (Chilliard, 1997). Il est caractérisé par une flaveur particulière et un goût plus relevé que celui du lait de vache, en grande partie due à certains acides gras libres et à la lipolyse du lait (Chilliard, 1997; Jaubert, 1997; Morgan et al, 2001). Ce goût disparaît après avoir fait bouillir le lait.

1.2. Importance du lait de chèvre : (Dhartiben et al.,2016).

Le lait de chèvre offre une grande variété d'avantages pour la santé comme

- une meilleure digestibilité
- plus d'alcalinité
- moins de caséine α s1 que le lait de vache et est donc moins allergénique.
- Le lait de chèvre a également un antioxydant, antimicrobien, et propriété médicinale.
- Lait de chèvre contient un carotène supérieur (pro-vitamine A) ayant propriétés anticancéreuses. Il est également utile dans le traitement des ulcères en raison de son tampon acide plus efficace capacité.
- Le lait de chèvre a une saveur plus forte en raison de la libération d'acides gras à chaîne courte au cours manipulation brutale, qui dégage une odeur de chèvre.
- Contrairement au lait de vache, qui est légèrement acide, le lait de chèvre est nature alcaline, ce qui est très utile pour les personnes problèmes d'acidité.
- Le lait de chèvre est plus digeste en raison de sa petite taille globules, protéine uniforme, distribution de graisse, et moins de lactose. Le lait de chèvre modifié peut également être utilisé pour l'alimentation des bébés.
- Le lait de chèvre fournit un sain et un alimentation équilibrée pour les enfants allergiques à la vache lait, car les symptômes peuvent disparaître avec du lait de chèvre consommation.
- La valeur nutritionnelle du lait est étroitement liée à sa composition, qui est très affectée par des facteurs tels que la race, l'alimentation, le stade de lactation et saison.
- Particulièrement pendant la lactation, il y a changements significatifs dans la quantité et la composition de lait de chèvre.
- Divers symptômes sont réduits en raison d'allergie aux protéines, incapacité à digérer le lactose avec des personnes intolérantes au lactose) en prenant du lait de chèvre.

2. Caractéristique du lait de chèvre :

Comme le lait de chèvre a de nombreuses propriétés thérapeutiques et de valeur nutritive, divers chercheurs ont étudié composition chimique et caractéristiques physiques; où ces changements de composition, peuvent modifier le traitement qualité du lait de chèvre. Ainsi, cette étude est consciente de certaines propriétés physico-chimiques du lait de chèvre en tant que régime fonctionnel pour la santé humaine (Hayam et *al.*, 2014).

2.1. Les Caractéristique organoleptiques : (Jean.,1997)

Tableau 01: caractéristique organoleptique de lait de chévre.

	Caractère normal	Caractère anormal
Couleur	Blanc mat Blanc jaunâtre: Lait riche en crème	Gris jaunâtre: Lait de mammit Bleu,jaune... lait coloré par des substance chimiques ou des pigments bactériens
Odeur	Odeur faible	Odeur de putréfaction, De moisi, de rance...
Saveur	Saveur agréable	Saveur salée: lait de mammit Goût amer: lait très pollué par des bactéries
Consistance	Homogène	Grumeleuse : mammite Visqueuse ou coagulée : pollution bactérienne

2.2. Caractéristiques physiques et (bio)chimiques :

Les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre varie de manière importante d'une étude à une autre, car rendant compte de situations locales qui ne peuvent pas être généralisées. Ces laits semblent cependant partager beaucoup de points communs avec le lait de vache. Nous ne mentionnerons ici que les spécificités par rapport au lait de vache qui semblent marquantes d'après la revue de Park et al (2006)

- absence de β -carotène totalement converti en vitamine A
- déficit en acide folique et vitamine B12

- des globules gras de plus petite taille que ceux des laits de vache, similaire à celle du lait de brebis, permettant une meilleure homogénéisation dans le lait et ainsi sa meilleure digestibilité, et permettant une lipolyse accrue par augmentation de la surface.
- des micelles de caséine contenant plus de calcium et de phosphate inorganique, moins hydratées, moins stables à la chaleur, et perdant plus facilement leur β -caséine
- solubilisation plus élevée des caséines à 20 °C, ainsi que du phosphate colloïdal et des caséines au froid, entraînant des rendements moins élevés en fabrication fromagère
- déficit en agglutinine, qui rendrait difficile son écrémage, surtout à froid
- stabilité plus faible lors du chauffage
- structure plus lâche lors de la coagulation acide (yaourt), donc une fermeté plus basse.
- des taux d'acides gras à courte et moyenne chaîne plus élevés, en particulier deux fois plus d'acide caprique, caproïque et caprylique associé au goût « chèvre »
- rapport acide laurique sur acide caprique unique (12/10), plus bas (0.46 vs 1.16).
- des taux plus bas d'acide orotique et plus élevés d'éthers glycérol
- sensibilité plus élevée à la lipolyse spontanée due à des différences de localisation de la lipase
- taux de cholestérol plus bas (11/14 mg/100g)
- la β -caséine est la caséine majeure avec 58 % des caséines (α S1 avec 38 % dans le lait de vache), suivie par la β -caséine La quasi-absence de l' α S11-caséine fait que les sujets allergiques uniquement à cette protéine supportent souvent le lait de chèvre.
- taux d'azote non protéique plus élevé (8.7 % vs 5.2 %)
- quantités d'enzymes différentes (exemples : ribonucléase, phosphatase, xanthine oxydase, lipase)
- plus de calcium, potassium, phosphore, magnésium et chlore ; moins de sodium et de soufre.

Le tableau 02 montre les valeurs de graisse et de lipolyse de lait de chèvre avec et sans traitement thermique, soumis à différentes vitesses d'essorage et températures, qui étaient utilisés pour sélectionner le meilleur processus d'écémage.

La teneur en graisse allait de 0,00 (A, D, K, L) à 0,22 (I) g / 100 mL et aucune des valeurs supérieures à 0,5 g/100 mL (Argentine, 1969, Güler & Gürsoy-Balc, 2011). Non statistiquement différences significatives entre les échantillons ($P \leq 0,05$) a trouvé.

Les valeurs de lipolyse variaient de 1,15 (K) à 5,45 (G) $\mu\text{eq FFA} / \text{mL}$; la dernière valeur avec un niveau élevé de FFA serait inacceptable pour la plupart des gens en raison des changements dans la saveur (Noelia et al., 2014).

Tableau 02: Teneur en matière grasse (g / 100 mL) et lipolyse (μeq d'acides gras libres / ml) de lait écrémé.

Traitement thermique	Grasse (g%)	FFA ($\mu\text{eq}/\text{mL}$)
A	0.00 \pm 0.00	1.41 \pm 0.04
B	0.05 \pm 0.07	1.81 \pm 0.10
C	0.10 \pm 0.00	1.67 \pm 0.09
D	0.00 \pm 0.00	1.92 \pm 0.04
E	0.15 \pm 0.07	1.99 \pm 0.04
F	0.15 \pm 0.07	1.54 \pm 0.09
G	0.05 \pm 0.07	1.45 \pm 0.05
H	0.15 \pm 0.07	1.34 \pm 0.04
I	0.22 \pm 0.03	1.54 \pm 0.00
J	0.05 \pm 0.07	1.94 \pm 0.04
K	0.00 \pm 0.00	1.15 \pm 0.14
L	0.00 \pm 0.00	1.65 \pm 0.02

Moyens \pm écart-type (n = 3). Les moyens dans la même rangée avec des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$). g: grammes; mL: millilitre; FFA: acides gras libres; μeq : milliéquivalents; min: minutes.

2.3. Caractérisation microbiologique de la chèvre Lait :

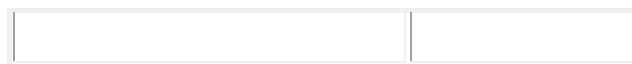
Repartissent les microorganismes de lait, selon leurs importances, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminant. La flore contaminant est subdivisée en deux sous classes: la flore d'altération et la flore pathogène. **Michel lamontagne et al (2002)**

2.3.1. Flore indigène ou originelle :

c'est l'ensemble des microorganismes dans le lait à la sortie du pis. Le lait devrait contenir moins de 5.10^3 UFC/mL. Les germes dominants sont principalement des microorganismes mésophiles.

Tableau 03 : flore indigène de lait cru. (**Michel lamontagne et al., 2002**)

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



2.3.2 Flore Contaminant : c'est l'ensemble des microorganismes ajouté au lait, de la récolte à la consommation. Elle peut se composer de :

- **La flore d'altération** : cause des défauts sensoriels ou réduire la durée de conservation du produit. Les principaux genres identifiés sont *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, les coliformes (*Escherichia et Enterobacter*) et les sporulées tel que *Bacillus sp et Clostridium sp.*, et certaine levure et moisissure ;
- **La flore pathogène** : peut avoir trois sources l'animal, l'environnement et l'homme. Les principaux germes sont : salmonella sp., staphylococcus aureus, clostridium botulinum, clostridium perfringens, bacillus cereus, yersinia enterocolitica, listeria monocytogenes, escherichia coli, campylobacter jejuni, shigella sonnei et certaines moisissures.

Les tableaux 4 et 5 montre la composition chimique et qualité microbiologique du lait de chèvre cru et du lait de chèvre pasteurisé (Noelia et al., 2014)

Tableau 04: Composition chimique et qualité microbiologique du lait de chèvre cru entier.

Lait de chèvre cru entier (100 mL)	
pH	6.7°D
Acid	10.50±0.51
Humidité (g)	87.50±0.70
Glucides (g)	5.01±0.00
Protéines (g)	2.90±0.00
Graisses (g)	3.56±0.00
Ash(g)	1.03±0.00
Bleu de méthylène	Pas de changement de couleur pendant 5,5 heures
Aérobies mésophiles	2.6×10^7 CFU/ml
Coliformes totaux	2.5×10^4 CFU/ml
Cellules somatiques	331.000 cellule / mL

Moyens ± écart-type (n = 3). mL: millilitre; g: grammes; CFU / mL: Unités de formation de colonies / mL.

Tableau 05: Composition chimique et qualité microbiologique du lait de chèvre pasteurisé écrémé.

Lait de chèvre écrémé pasteurisé (100 mL)	
Humidité (g)	91.97 ±0.35
Glucides (g)	4.39 ±0.00
Protéines (g)	2.63 ±0.00
Graisses (g)	0.10 ±0.00
Ash (g)	0.91 ±0.11
Calcium (mg)	163.57± 3.95
Phosphore (mg)	108.26± 10.48
Aérobic mésophile	9 × 10 ² CFU mL ⁻¹
Coliformes totaux	0 CFU mL ⁻¹

Moyens ± écart-type (n = 3). mL: millilitre.

3. Des races laitières sélectionnées : (Daniel., 2000)

3.1. Quelques élément d’histoire de la chèvre :

La chèvre a toujours fait partie du quotidien de l'homme et ce depuis au moins 7000 à 7500 ans avant J-C comme le prouvent des fouilles effectuées en Iran. Cette Chèvre était déjà domestiquée. Son rôle ne fit que croître durant les civilisations grecques et romaines. On a même la preuve que les peuples du Nord, de Scandinavie, avaient leurs troupeaux. L'arrivée des caprins en France date de la conquête romaine, soit environ 200 ans avant notre ère. Les troupeaux de chèvres Romaines suivaient les conquérants dans leur conquête de la Gaule et même de la Grande Bretagne. Rapidement chaque famille comprit l'intérêt d'avoir quelques bêtes Pour lui fournir de la viande, du lait et surtout du fromage. Chaque région finit par Avoir une race à elle, adaptée aux conditions de vie. Mais le cheptel a commencé à Diminuer après la guerre de 1870, avec l'urbanisation. Ce fut alors l'apparition de Grands troupeaux que les chevriers amenaient près des grandes villes durant la Période de lactation afin de vendre le lait et les fromages. Avec les moyens de Transport modernes, le cheptel caprin connaît un nouvel essor jusqu'aux grandes Épidémies de fièvre aphteuse de 1950 qui déciment des troupeaux entiers. La Relance se fait ensuite, mais en privilégiant les races compétitives au détriment des races régionales.

3.2. Les race africains :

Les races qui se développèrent dans tous l’Afrique du Nord et dans les pays arabes du Golfe persique furent avant tout de très bonnes laitières, mais elles fournissaient également la viande aux nomades. Ces derniers avaient et ont encore de véritables troupeaux, contrairement aux habitudes européennes, car une tribu nomade comprend presque toujours un grand nombre d’adultes et d’enfant, et les chèvres supportent mieux que les moutons les forts chaleurs et une maigre nourriture. Et puis les nomades avaient remarqué que le lait cru de

chèvre était nettement meilleure pour les enfants que celui des moutons ; on a vu par la suite que le lait de chèvre ne renferme jamais de bacille de Koch.

Les arabes font aussi une boisson fermentée avec le lait de chèvre, le kéfir qui veut dire délice ; cette boisson soigne très bien certaines affections gastro-intestinales. Et puis les arabes ont toujours élevé beaucoup de boucs pour la peau avec laquelle ils fabriquent encore les guerbas, des outres légères et isolantes, faciles à transporter.

Les races les plus répandues aujourd'hui dans tous ces pays sont la Nubienne et Syrienne, deux races qui sont bien acclimatées dans les pays africains du sahel.

3.3. Les races européennes :

Les chèvres commencèrent à s'étendre sur toute l'Europe au fur et à mesure des conquêtes romaines, des races spécifiques aux régions virent le jour ; mais le nombre de ces nouvelles races resta toujours modeste, rien à voir avec celui des races ovines.

Parmi les races anciennes reconnues, on peut citer l'Alpine qui s'installa dans tous les pays de l'arc alpin, la pyrénéenne qui se développa sur le versant espagnol autant que sur le versant français. A Malte on peut encore voir une race locale, appelée chèvre de Malte, qui ressemble beaucoup à ce que devait être la chèvre de la Grèce antique, selon des documents trouvés dans des fouilles.

3.4. Les races asiatiques :

En Asie les races les plus développées ont été et sont encore des races lainières. Au Tibet, on élève la race de Cachemire pour sa toison toujours aussi recherchée. La race Angora vient d'Asie Mineure et elle a longtemps été une telle source de revenus que les bêtes étaient même gardées par des soldats durant des siècles. Cette race Angora arriva en France dans les années 1830 et c'est surtout en Algérie que les colons français développèrent la race.

3.5. Les autres races du monde :

Quant au reste du monde, l'élevage caprin est quasi insignifiant industriellement parlant ; les chèvres de races incertaines sont surtout élevées en petits groupes par paysans pauvres.

A noter encore la présence d'une race sauvage aux Etats-Unis, dans les montagnes Rocheuses, il s'agit de la chèvre des Neiges dont la robe reste blanche toute l'année et dont le poids du mâle peut dépasser les 150 kg.

4. Influence quelques facteurs sur la composition et la propriétés du lait de chèvre : (Hayam et al 2014)

La composition du lait de chèvre diffère largement selon de nombreux facteurs divers. Les trois principaux facteurs efficaces sont les races (races indigènes ou sélectionnées), le stade de lactation et l'alimentation ou les composants des rations.

4.1. Influence de la race :

L'origine et le race de chèvre ont nettement affecté le rendement et la composition du lait. Il est nécessaire de distinguer entre deux types de lait de chèvre:

- le premier (qui est le plus commun) est produit à partir de races indigènes qui ont un faible rendement laitier moyen mais un solide total élevé.
- Le second type est produit par des races hautement sélectionnées avec un rendement élevé mais avec un solide total inférieur.

Tableau 06: La composition brute moyenne du lait de chèvre produit à partir de différentes races dans différents pays. (Helmut et al 2012)

Country	Breed	%					References
		Total solids	Fat	Protein	Lactose	Ash	
Germany	Improve fawn	12.43	3.92	2.9	4.01	-	Graf <i>et al.</i> (1970)
Nigeria	Saanen	12.15	3.41	3.07	4.54	-	Mba <i>et al.</i> (1975)
Nigeria	African Dwarf	18.68	6.90	3.91	6.30	0.82	Akinsoyinu <i>et al.</i> (1977)
Australia	Saanen	13.47	4.61	3.39	4.93	-	Ranawana & Kellaway (1977)
USA	Pygmy	21.55	7.76	4.71	5.58	-	Jeness (1980)
Egypt	Breed in Sinai peninsula	12.91	4.04	3.35	4.48	0.84	El-Zayat <i>et al.</i> (1984)
Iraq	Native	13.39	3.42	3.76	5.3	0.83	Ali and Hassan (1988)
Egypt	Baladi	12.33	4.06	2.92	3.88	0.80	El-Alamy <i>et al.</i> (1990)
Greece	---	11.76	3.44	3.35	4.30	0.79	Voutsinas <i>et al.</i> (1992)
Saudi Arabia	Masri	--	3.06	3.41	4.51	0.77±0.7	Sawaya <i>et al.</i> (1994)
Poland	Improved white breed	--	4.1	2.9	--	0.80	Szymanowska & Lipiecka (1997)

Helmut et Fiechter (2012) ont étudié la composition chimique et les propriétés physiques des espèces de lait de chèvre en Autriche. Ainsi, des échantillons de lait de six races de chèvres laitières en Autriche (Bunte Deutsche Edelziege, Pinzganer Ziege,

Saanengege, Strahllängege, Toggenburger Ziege, WeiBe Deutsche Edelziege) ont été analysés pour les caractéristiques physico-chimiques pendant 8 mois de Mars à Octobre.

Les variations saisonnières considérables, mais presque aucune différence statistiquement significative entre les échantillons de lait de ces six races de chèvre ont été observées concernant la plupart des paramètres.

4.2. Stade de lactation :

Le stade de lactation de la chèvre est nettement affecté par le rendement ou la composition du lait. CsapoJanos et al. (1984) ont signalé que les teneurs en ST, en caséine et en NPN augmentent graduellement tout au long de la période de lactation, tandis que les TP et les PT fluctuent et augmentent ensuite brusquement à la fin de la période de lactation.

Bhosale et al. (2009) ont indiqué que la lactation avait effet croissant significatif sur la graisse, la protéine, la cendre, TS,SNF, acidité titrable et viscosité. Tout le lait les composants sont progressivement augmentés de I à IV lactation à l'exception du lactose et du pH.

Hejtmankova et al. (2012) a étudié les changements dans la composition de la protéine de lactosérum du blanc tchèque à poils courts chèvre tout au long de la période de lactation et trouvé qu'à la fin de la période de lactation, la teneur en β -Ig augmente fortement et le ratio β Lg / λ -La atteint une valeur maximale de 1,94% dans le lait de chèvre. En outre, le lait de chèvre contient un profil d'acides aminés similaire à lait de brebis, mais le profil d'acides aminés dans la protéine de lactosérum diffère de celui du lait.

4.3. L'alimentation :

La ration est le principal facteur qui affecte le lait composition car elle est la source des constituants du lait, et contrôle le processus de fermentation dans le rumen. Pour exemple,

El-Alamy et al. (1987) ont signalé que les chèvres nourri avec un concentré et une ration de fourrage de 70: 30 des teneurs significativement plus élevées en graisse et en TS.

Morsy et al. (2012) ont conclu que la supplémentation en huile d'anis, huile de clou de girofle ou genévrier pour les chèvres allaitantes améliore la fermentation ruminale en tant que production de propionate et réduit la proportion d'acétate et les protéines lactières améliorées des chèvres en lactation. La supplémentation en huile de genévrier a amélioré les acides gras linoléique et oméga 3 conjugués dans les graisses du lait. La supplémentation en huile de genévrier pour les animaux laitiers peut contribuer à améliorer les propriétés du lait en matière de santé.

1-Historique :

les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans les connaître et sans comprendre la base scientifique de leur utilisation, tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (**Sallofe, 1994**).

Les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie et dont les fossiles très bien conservés datent d'environ 2,7 milliards d'années (**Dridger et al., 2009**). La production de cultures des bactéries et l'emploi des ferments se développent au début du 20^{ème} siècle (**Dridger et Prevost H, 2009**).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 cité par Penaud, (2006). Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (Metchnikoff, 1907). Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabricant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour (**Bibel, 1988**).

2-Définition :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires qui se retrouvent dans différents types d'habitats (Dellagio et al., 1994 ; Matamoros, 2008). Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophe et chimio-organotrophe constituées de cocci et de bacilles (Badis et al, 2005). Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers et produisent de l'acide lactique. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore qui permet la fermentation spontanée de produits alimentaires (Stiles et al., 1997).

Bien avant que l'on soit conscient de leur existence, les bactéries lactiques ont toujours été utilisées cependant, comme ferments elles ne sont utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poissons, de légumes et de fruits (**Ross et al., 2002**).

3. Habitat :

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucre simple. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de végétaux ou autres aliments. 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 (Leveu et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001. Hadaf, 2012).

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (de ROISSART, 1986).

4-caractéristiques généraux des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques (LAB) sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (BADIS *et al.*, 2005). Elles peuvent avoir différentes formes:

- sphériques (coques/genre *Streptococcus* et *Lactococcus*...),
- bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*)
- ou encore ovoïdes (*Leuconostoc* ssp.) (LUQUET et CORRIEU, 2005; GALVEZ *et al.*, 2011).

Se sont des microorganismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aérotolérants et ne possédant pas de catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (Raynaud., 2006). ayant une composition de base d'ADN inférieure à 50% molaire G + C. Ils manquent généralement de catalase, bien que la pseudo-catalase soit détectée dans des cultures à faible concentration en sucre, et ils ont besoin d'un glucide fermentable pour la croissance(Georges et al.,2008).

ces micro-organismes peuvent être divisés en deux groupes:

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose
- Hétérofermentation : la fermentation du glucose aboutit à la formation l'acide lactique et d'autre composés : éthanol, CO₂, acide acétique et autre acide organique Priyanka et Prakash ; 2009, HadeF, 2012).

Ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase, elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al, 1994; Salminen et al, 2004; Zhang et Cai, 2014).

Les LAB ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (HOGG, 2005).

5. Classification des bactéries lactiques :

5.1. Critères de la classification : (SCHLEIFER *et al.*, 1985; SCHLEIFER, 1986 ; FARROW *et al.*, 1989)

- ❖ La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variants au sein d'une même espèce. Ces tests sont :
 - Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
 - Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire.
 - La croissance des cellules sur des milieux hostiles
 - Et la synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages.

- ❖ Puis, des études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces selon les critères suivants :
 - La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'observer le type d'espèce selon la nature de la liaison peptidique.
 - Et la composition de l'ADN mesurée par hybridation permet de différencier les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage en bases Guanine+Cytosine (G-C %) permet le rapprochement des genres *Streptococcus* (34-46%), *Leuconostoc* (36-43 %) et *Pediococcus* (34-42 %). Le pourcentage de G-C des espèces du genre *Lactobacillus* est très hétérogène et varie d'une espèce à une autre de 32 à 53 % (SCARDOVI, 1986).

Cependant, les espèces des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou *streptococcus*, dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 %, peuvent être regroupées dans la branche des *Clostridium* avec *Bacillus*, et séparées de la branche des *Actinomycétales* au G-C % supérieur à 50 %, comprenant *Propionobacterium* et *Bifidobacterium* (STACKEBRANDT *et al.*, 1983 ; KANDLER et WEISS, 1986b ; STACKEBRANDT et TEUBER, 1988).

Tableau 07: Les différents genres de bactéries lactiques.

Genres	Cellules		Fermentation	ADN G-C (%)	Références
	Forme	Arrangements			
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaînes	Homolactiques	34 - 46	SCHLEIFER, 1986
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaînes	Hétérolactiques	36 - 43	FARROW <i>et al.</i> , 1989
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34 - 42	SCHLEIFER, 1986
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaînes	Homolactiques et Hétérolactiques	32 - 53	KANDLER <i>et</i> WEISS, 1986a <i>et</i> b

5.2. Principaux genres des bactéries lactique :

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilliet* l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (Fig.1). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de :

● *Aerococcus* :

les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), α-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

● *Carnobacterium* :

ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

● *Enterococcus* :

ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9.6 et

par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C.

● ***Lactobacillus*** :

les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

● ***Lactococcus*** :

les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits.

● ***Leuconostoc*** :

ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

● ***Oenococcus*** :

les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

● ***Pediococcus*** :

ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C.

●Streptococcus :

les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

●Vagococcus :

les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

●Tetragenococcus :

ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires. Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

●Weissella :

les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al. 2004).

6. Domaines d'utilisation des bactéries lactiques :

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire :

6.1. Dans le domaine de l'agriculture:

Les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. Ainsi, on a pu observer chez le bétail une augmentation de 5 à 11% des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière (Salawu et

al,2001:khuntia et Chaudhary, 2002). L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotiques affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Weinberg et al, 2004 : Gollop et al,2005).

6.2. Dans le domaine de la santé :

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restes encore contre versés :

- *Améliore la digestion de lactose.
- *Le traitement de certaines infections ou diarrhées.
- *Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaries.
- *Utilisation dans l'élaboration des vaccins (Calvez et al., 2009).

Certains bactéries lactique spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinal. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbrueckii*, *sub sp bulgaricus* (Salminen et al, 2004).

6.3. Dans l'industrie agro-alimentaire :

Les bactéries lactique sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales.

Eu égard à leur pouvoir acidifiant, leur capacité à améliorer la flaveur et la texture des aliments, les bactéries lactiques sont de loin des agents d'amélioration de la qualité organoleptique des aliments (Bigret, 1989).

Dans les produits laitiers, ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait, la formation des composés aromatiques, la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

Pour optimiser les caractéristiques organoleptiques du lait, les bactéries lactiques sont souvent utilisées en association. C'est le cas de *Streptococcus thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, utilisées dans la fabrication du yaourt. Dans les produits carnés, les bactéries lactiques améliorent la qualité hygiénique et marchands en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables. Les bactéries lactiques favorisent en outre, l'accélération du processus de maturation et assurent une meilleure conservation de ces produits.

7. notion des probiotiques :

7.1. Définitions :

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivant qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriés ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO., 2001) ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt. . (Makhloufi., 2012).

7.2. Rôle du probiotique :

- Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque.
- La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité.
- Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défense contre un agent exogène.
- Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (Makhloufi., 2012).

7.3. Applications des probiotiques :

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis*.

- **Traitement des diarrhées**

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner et al., 2005) .

- **Traitements gastriques**

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (**Reid *et al.*, 2003**).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical.

1. Définition légale du genre *Lactococcus* :

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyl. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (TAMIME, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (POT, 2008).

Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (ZHANG et CAI, 2014).

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (DALMASSO et al., 2008).

2. Morphologie :

Les lactocoques se présentent sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de 0,5 à 1µm de diamètre formant des chaînes de longueur variable (figure 01).

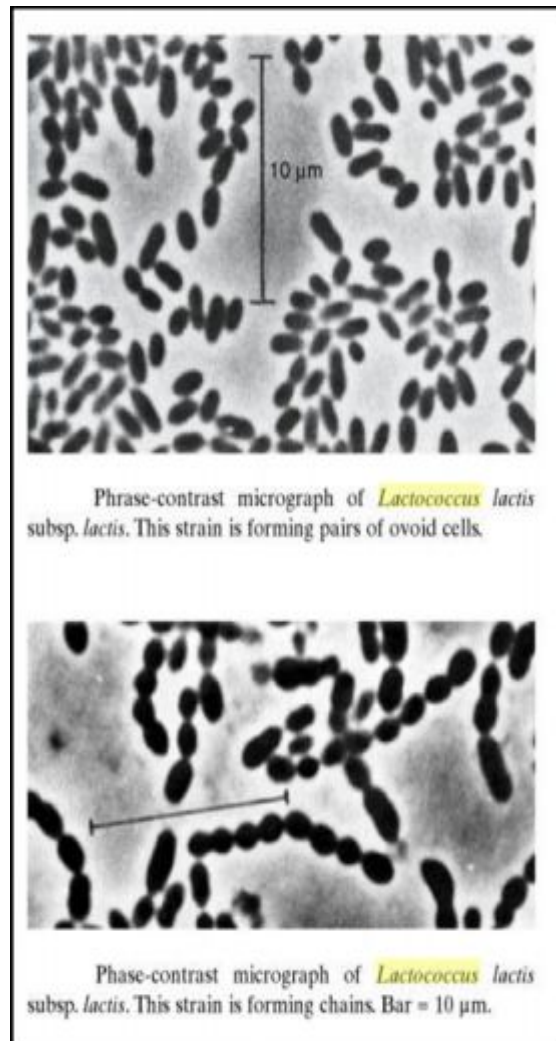


Figure 01 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).

3. Habitat et rôle :

Les lactocoques sont trouvés sur les végétaux et dans les produits laitiers **Tableau 8**.

Les lactocoques se trouvent en grande quantité dans le lait cru et une large gamme de produits laitiers tels que le beurre et les laits fermentés, et de nombreuses variétés de fromages (soit parce qu'ils y ont été ajoutés comme levains (tableau 13), soit parce que les produits laitiers ont été fabriqués à partir de lait cru à des températures favorables au développement des lactocoques. Les végétaux sont le réservoir naturel des lactocoques laitiers. Les lactocoques laitiers utilisés depuis longtemps dans les levains ont perdu certains phénotypes et acquis d'autres phénotypes suite à la domestication de lactocoques issus de végétaux (Bachmann et al., 2012).

Les lactocoques isolés de végétaux ont, par exemple, la capacité à fermenter une plus large variété de glucides et à produire plus de composés d'arôme, une autotrophie pour un nombre d'acides aminés supérieur, et une plus forte tolérance aux stress (Nomura et al, 2006; Tanous et al., 2006; Rademaker et al., 2007; Siezen et al., 2007).

Tableau 08 : Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des exploitations agricoles (Teuber et Geis, 2006)

Sample	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	New, undefined <i>Lactococcus</i> sp.
Cheese plant					
- cheese milk	+	+			
- cheese whey	+	+			
- waste whey	+	+	(+)		
- wastewater tank	+	+	+	+	+
- wastewater disposal site soil	(+)	(+)		(+)	
- grass	(+)	(+)	(+)	(+)	
Farm samples					
- raw milk	+	+	+	+	+
- milk machine	+	+			
- udder	+	+			
- Saliva, cow	(+)	(+)			
- Saliva, bull	(+)				
- skin, cow	(+)		(+)		
- skin, bull	(+)		(+)		
- grass		(+)		(+)	
- soil	(+)		(+)	(+)	
- silage	(+)				

+ = detected by direct plating; (+) = detected by plating after enrichment.

Tableau 09 : Lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers (Teuber et Geis, 2006).

Type of product	Composition of starter culture
1. Cheese type without eye formation (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 to 98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2 to 5%
2. Cottage cheese, quarg, fermented milks, cheese types with few or small eyes (e.g., Edam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%; or <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85 to 90%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%
3. Cultured butter, fermented milk, buttermilk, cheese types with round eyes (e.g., Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70 to 75%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. " <i>diacetylactis</i> ," 15 to 20%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2 to 5%
4. Taette (Scandinavian ropy milk)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
5. Viili (Finnish ropy milk)	<i>Oidium lactis</i> (covers surface); <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
6. Casein	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
7. Kefir	Kefir grains containing lactose-fermenting yeasts (e.g., <i>Candida kefir</i>), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranoformans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

*The quantitative composition has been taken from the culture catalog of a major worldwide supplier.

Dans le domaine laitier, les lactocoques sont directement impliqués dès les premières étapes dans le processus de transformation de produits laitiers variés tels que le beurre, les laits fermentés et de nombreux fromages; ils sont toujours présents dans les levains acidifiants mésophiles, en association ou non avec des leuconostocs et des streptocoques thermophiles. Certaines activités non identifiées permettent aux leuconostocs de se multiplier (Hemme et Foucaud-Scheuneman, 2004).

Ils jouent un rôle essentiel dans l'élaboration des caractéristiques de nombreux produits fermentés, en particulier les produits laitiers, de part leurs activités métaboliques variées :

- production/consommation d'acides et de bases,
- protéolyse des caséines,
- biosynthèse de composés d'arôme (cf. LAB §II-2),
- et réduction du potentiel redox. Le potentiel redox affecte de nombreuses caractéristiques des produits laitiers en agissant sur la croissance et les activités des microflore utiles, d'altération et pathogènes, ainsi que sur la production et la stabilité de composés d'arôme l'O₂, une des composantes du potentiel redox, peut en outre être responsable de la coloration brune de certains fromages (Tachon et al., 2010).

4. Caractéristiques physiologiques et métaboliques :

Les lactocoques sont des bactéries mésophiles homofermentaires (figure 22) produisant la forme L du lactate. Leur température optimale de croissance est de 30 °C. Le lactate peut constituer 90% des produits de fermentation du lactose. A côté du lactate, le pyruvate peut conduire à la production de quantités importantes d'autres métabolites (figure 23) dans certaines conditions de culture ou chez certains mutants. Pour leur croissance, les lactocoques ont généralement besoin d'un apport en certains acides aminés (Ayad .1999) tels que l'acide glutamique, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la valine, et la méthionine (Cocaign-Bousquet et al., 1995).

Chez *Lc. lactis*, la croissance sur lait est diauxique; les deux phases exponentielles sont séparées par une phase pendant laquelle sont synthétisées les protéases de paroi. Pendant la première phase exponentielle, *Lc. lactis* consomme les acides aminés et les peptides présents dans le lait. Pendant la seconde phase exponentielle, *Lc. lactis* consomme les caséines. La capacité à utiliser les caséines (quantité de protéase synthétisée et vitesse d'hydrolyse des caséines) limite le taux de croissance bactérien (Bruinenberg et al, 1992; Helinck et al, 1997).

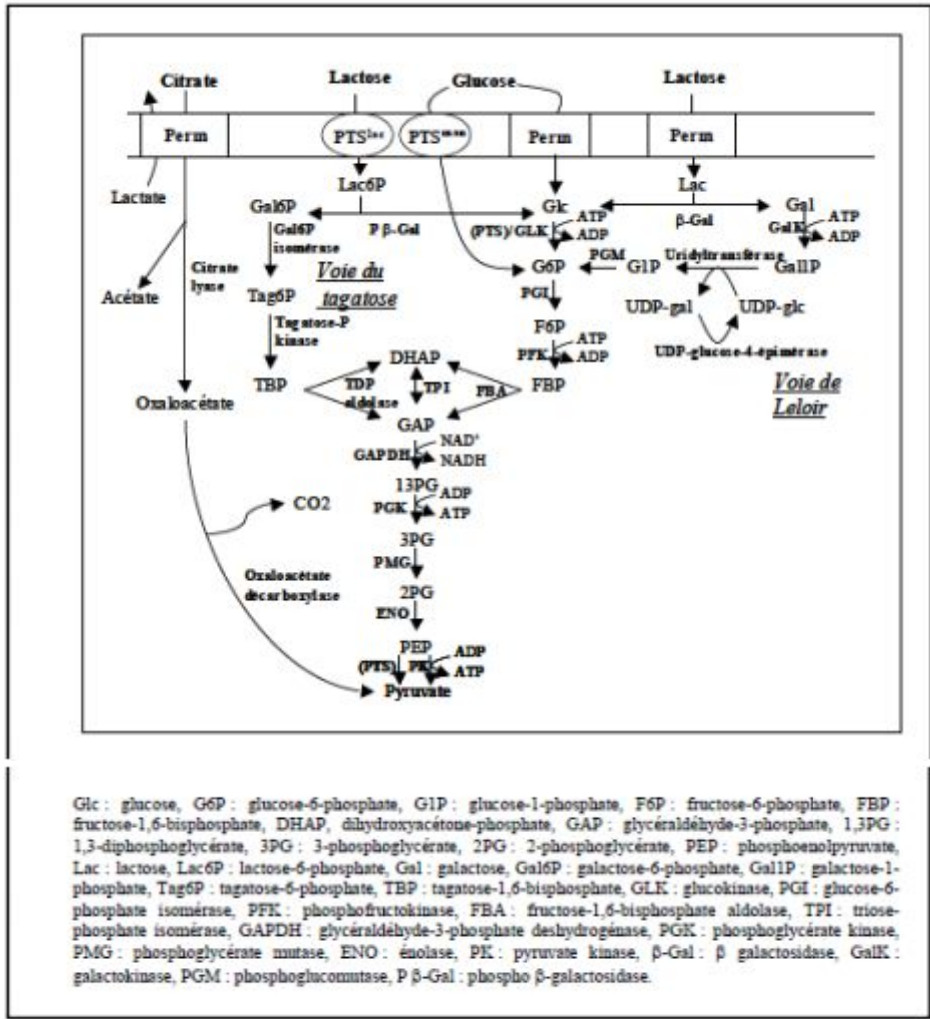


Figure 02 : Métabolisme du glucose, du lactose et du citrate par Lc. lactis en amont du pyruvate (Raynaud, 2006)

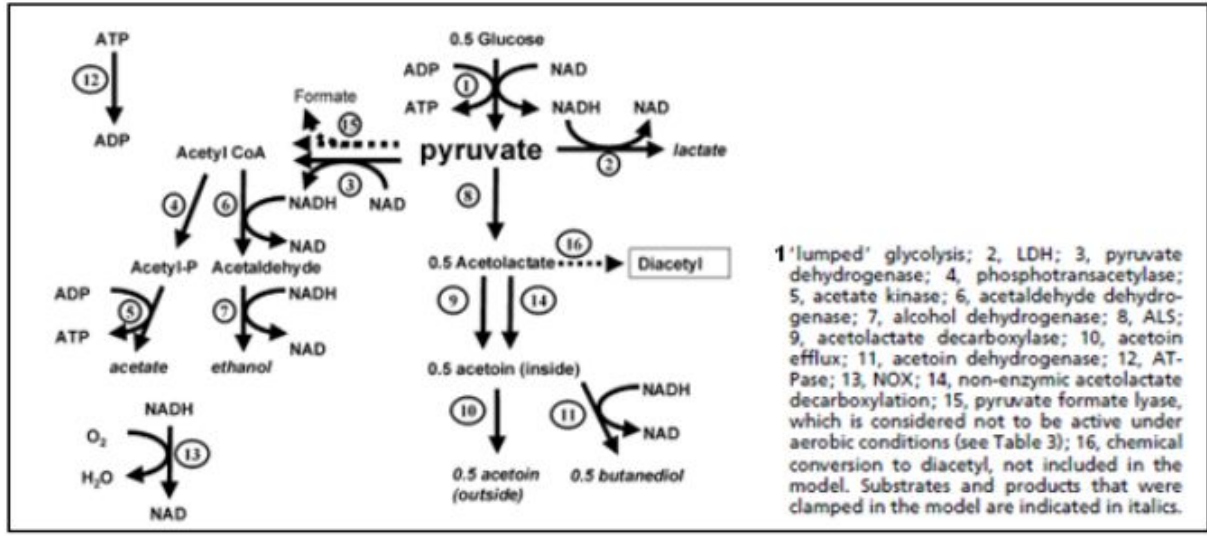


Figure 03 : Distribution des atomes de carbone dans les métabolites dérivés du pyruvate chez Lc. lactis (Hofnagel et al., 2002)

L'utilisation du citrate par *Lc lactis* est liée à la présence d'un plasmide de 7,9 kb portant l'information nécessaire au transport du citrate à l'intérieur de la cellule (Kempler et McKay, 1979). Elle permet à la cellule de lutter contre l'acidification du cytoplasme (figure 24).

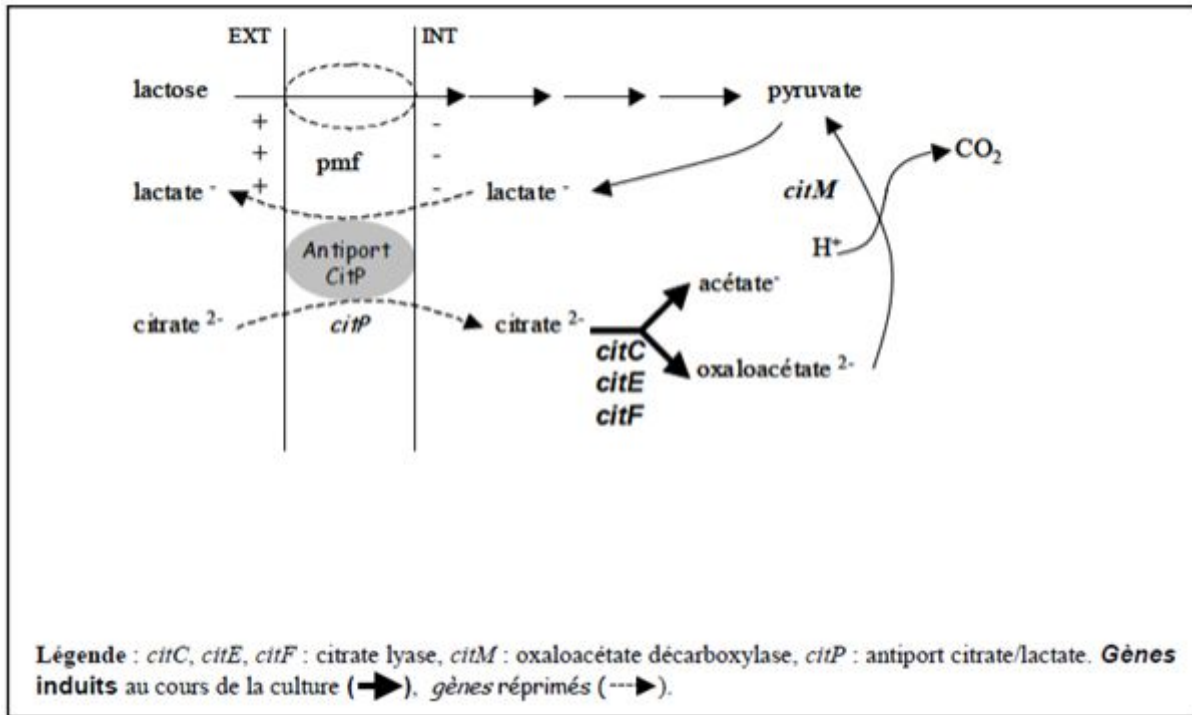


Figure 04 : Cycle du TCA et lutte contre l'acidification du cytoplasme (Raynaud, 2006)

Pour réoxyder le NADH issu du catabolisme des oses, *Lc lactis* est capable, à côté de la réduction du pyruvate, d'utiliser l'O₂ indépendamment d'une chaîne respiratoire, puis d'autres accepteurs d'électrons de nature inconnue couplés à une chaîne de transport d'électrons, abaissant ainsi le potentiel d'oxydo-réduction du lait à des valeurs négatives (Tachon et al., 2009).

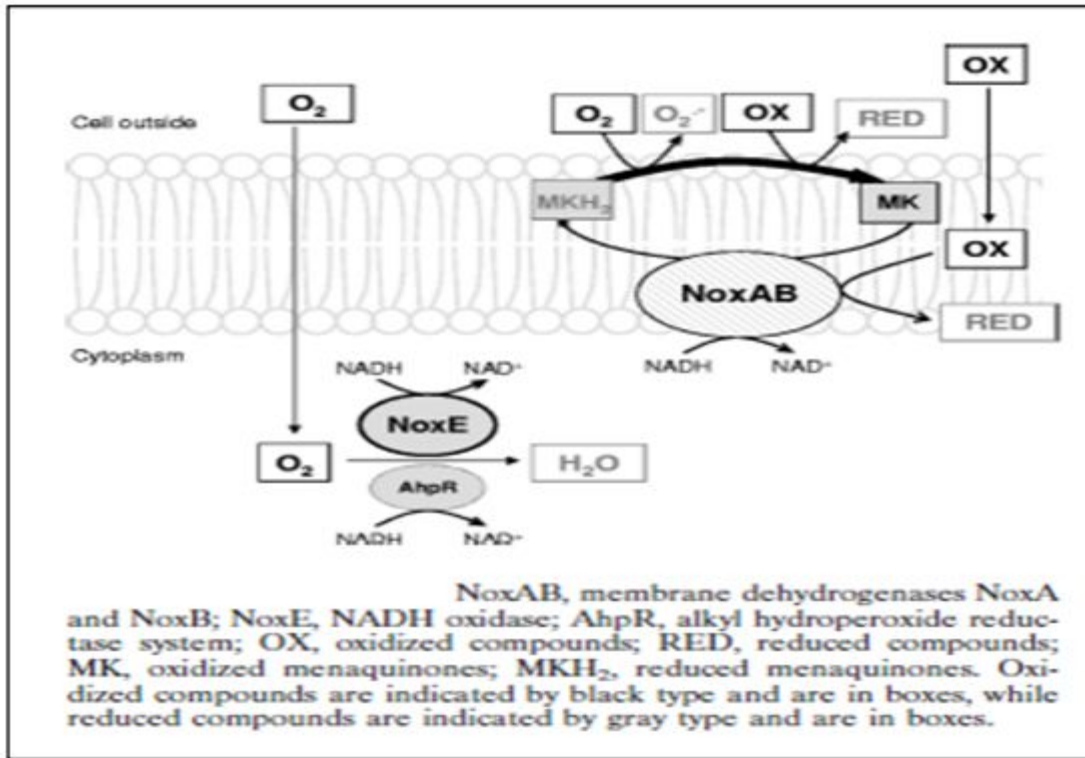


Figure 05 : Représentation schématique du mécanisme de réduction du lait par *Lc. lactis* (Tachon et al., 2009)

Après consommation du lactose, certains lactocoques, dont *Lc. lactis* subsp. *lactis*, peuvent dégrader l'arginine (tableau 13) par la voie de l'arginine désaminase (figure 26). C'est une voie énergétique et permettant de lutter contre l'acidification du cytoplasme. Cette voie permet de produire une molécule d'ATP par molécule d'arginine consommée et de produire de l'ammoniac. Cette voie est formée de trois enzymes agissant successivement : l'arginine désaminase(AD), l'ornithine carbamoyl-transferase(OCT) et la carbamate kinase(CK).

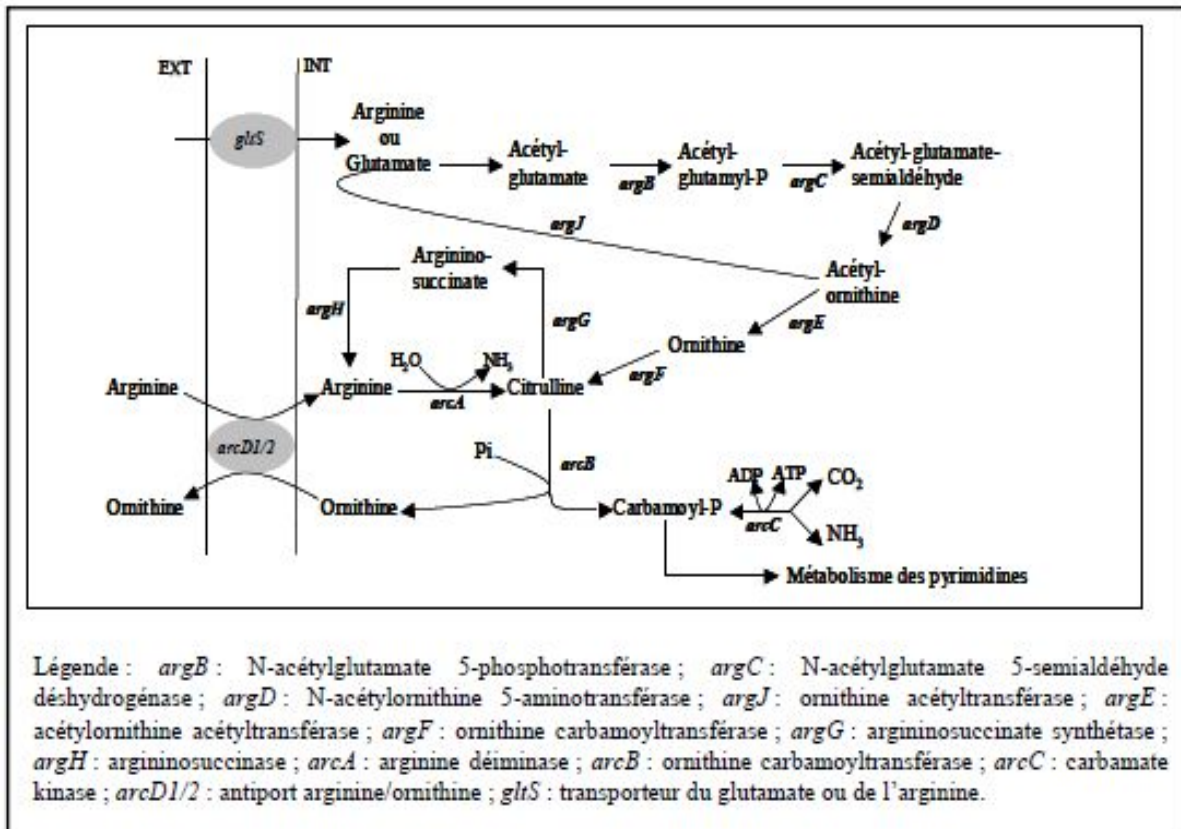


Figure 06 : Représentation schématique du métabolisme de l'arginine chez *Lactococcus lactis* (Raynaud, 2006)

5. Taxonomie :

Les lactocoques comportent actuellement 7 espèces; seule l'espèce *Lc. lactis* comporte des sous-espèces, au nombre de 4 actuellement (*lactis*, *cremoris*, *hordniae*, et, depuis 2011, *tractae*) (<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>). La sous-espèce *lactis* comporte le biovar *diacetylactis* (utilise le citrate), considérée auparavant comme une sous-espèce. La sous-espèce *hordniae*, très proche de la sous-espèce génotypique *lactis*, ne fermente pas le lactose (tableau 14). La sous-espèce *tractae* est très proche de la sous-espèce génotypique *cremoris* (Figure 28). A l'inverse des 3 autres sous-espèces qui sont homofermentaires strictes, elle présente un métabolisme hétérofermentaire facultatif (tableau 10).

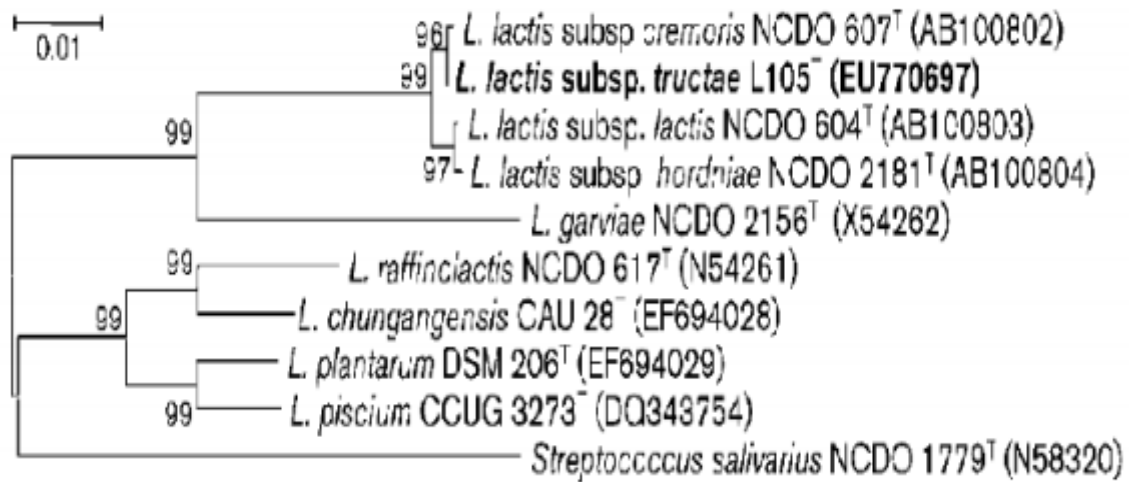


Figure 07 : Position phylogénétique de la sous-espèce *tractae* au sein des espèces de lactocoques d'après les séquences codant le 16S rDNA (Pérez et al, 2011)

Les espèces *Lc. lactis*, avec les sous-espèces *lactis* et *cremoris*, et *Lc. garviae* ont été isolées de produits laitiers. Jusqu'à maintenant, la différenciation phénotypique des sous-espèces *cremoris* et *lactis* de *Lc. lactis* était basée sur cinq critères : utilisation de l'arginine, et capacité à croître à 40 °C, en présence de 4% de NaCl, à pH 9.2 et en présence de maltose, ces cinq caractères étant négatifs pour la sous-espèce *cremoris*. Le phénotype *cremoris* est peu isolé de produits laitiers (Pérez et al., 2011).

6. Isolement et identification :

Tableau 10 : Différences phénotypiques entre *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. (Teuber et al., 1995). *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* n'existe plus (= actuellement *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*).

Properties	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>'diacetylactis'</i> †	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> †
Growth at 10°C	+	+	+
Growth at 40°C	+	+	—
Growth at 45°C	—	—	—
Growth in 4% NaCl	+	+	—
Growth in 6.5% NaCl	—	—	—
Growth at pH 9.2	+	+	—
Growth with methylene blue (0.1% milk)	+	+	—
Growth in presence of bile (40%)	+	+	+
NH ₃ from arginine	+	+	—
CO ₂ from citrate	—	+	—
Diacetyl and acetoin	—	+	—
Fermentation of maltose	+	+	Rarely
Hydrolysis of starch	—	—	—
Heat resistance (30 min at 60°C)	v	v	v
Serological group	N	N	N
GC content of DNA (mol%)	33.8–36.9	33.6–34.8	35.0–36.2

*Data taken from Teuber *et al.* (1991).
†+, positive; —, negative; v, variable.

Or, avec l'analyse génotypique de l'espèce *Lc. lactis*, on s'est aperçu que les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* ne sont pas superposables aux sous-espèces phénotypiques *lactis* et *cremoris* décrites antérieurement. Les souches de génotype *Lc. lactis* subsp. *lactis* peuvent en effet avoir le phénotype *lactis* ou le phénotype *cremoris* (Rademaker *et al.*, 2007). Les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* peuvent être distinguées par leurs profils phénotypiques, en se basant sur de nouveaux phénotypiques, à savoir fermentations de substrats carbonés, activités enzymatiques et productions de composés volatiles (Fernandez *et al.*, 2011). Si les 20 souches étudiées par Fernandez *et al.* (2011) avaient été identifiées sur la base des cinq phénotypiques classiques, elles auraient été toutes nommées *Lc. lactis* subsp. *lactis*, alors que la moitié d'entre elles présentent le génotype de la sous-espèce *cremoris*.

Les cinq critères phénotypiques classiques ne sont donc pas valables pour identifier les sous-espèces de l'espèce *Lc. lactis*. Par contre, ils restent pertinents pour caractériser les souches de *Lc. lactis* en technologie laitière: le phénotype classique *Lc. lactis* subsp. *lactis* est apprécié pour sa robustesse et sa tolérance à des températures et des concentrations en sel élevées alors que le phénotype classique *Lc. lactis* subsp. *cremoris* est appréciée pour fabriquer les fromages affinés (Fernandez *et al.*, 2011)

7. Intérêt technologique :

Dans le domaine laitier, les lactocoques sont directement impliqués dès les premières étapes dans le processus de transformation de produits laitiers variétés tels que le beurre, les

laits fermentés et de nombreux fromages ; ils sont toujours présents dans les levains acidifiants mésophiles (**Hemme et Foucaud-Scheuneman, 2004**).

Parmi les Intérêt technologique des lactocoques:

➤ **Production d'acide lactique :**

la production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière. Dans les produits fermentés la baisse du pH dépend du pouvoir tampon du milieu , de la concentration en substrats fermentescibles et de pH limite toléré par les ferments (**Antoine et al., 1993**).

➤ **Production d'arome :**

Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconservation optimal, d'un arome et d'une texture caractéristique des produits alimentaires fermentés. Ainsi *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* est considérée comme principale fournisseur de diacétyl et d'acétaldéhyde à partir des citrate (**Doleyres, 2003**).

➤ **Production de polysaccharides :**

Indépendamment de leur pouvoir acidifiant, les souches productrices d'agents épaississants confèrent aux produits laitiers des caractères rhéologiques particuliers portant notamment sur la viscosité. En général, l'augmentation de la viscosité est attribuée à la production d'un polysaccharide qui, selon une étude portant sur plusieurs souches, serait essentiellement composé de galactose et de glucose ainsi que de petites quantités de xylose, arabinose, rhamnose et mannose (**Girrafa et Bergere, 1987**).

➤ **Activité protéolytique :**

La croissance des bactéries lactiques dans le lait et leur activité dans les fromages ont des conséquences bénéfiques: la fermentation du lactose en acide lactique acidifie le milieu et conjointement avec la protéolyse des caséines préparent la coagulation du lait et synérèse du caillé nécessaire à l'affinage des fromages (**Aubert, 1998**).

MATERIELS ET
METHODES

➤ **But et lieu du travail :**

L'objectif recherché à travers cette étude consiste à isoler à partir du lait cru de chèvre des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactococcus* tout en procédant à leur purification et leur identification, suivie l'étude de leur aptitudes technologiques.

L'étude a eu lieu dans le laboratoire de microbiologie Appliquée, **Département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)**, Université Abdelhamide ibn badis de Mostaganem, Algérie.

I. Matériel

I.1 Milieux de culture (Voir l'annexe)

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

• **Géloses :**

KMK, ELLIKER, Mac Conky, BEA. M16 Bcp, Kempler et McKAY

• **Bouillons :**

Eau peptoné, Elliker liquide, Bouillon hypersalé 4% 6,5%, eau physiologique .Clark et Lubs, lait écrémé

I.2.Produits chimiques et réactifs :

- **Colorants:**Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, bleu de méthylène, Phénolphtaléine,
- **Les réactifs :** réactifs de Vogues Proskaeur (VPI et VP II),
- **sucres** (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, raffinose, lactose, sorbitol, mannose, l'amidon, esculine, rhamnose, maltose.)
- Tween 80, d'huile d'olive, NaCl, H₂O₂

I.3 Appareillage

I.3.1 Appareillage utilisée pour le test physico-chimique

-PH-mètre (Inolab MLM)

I.3.2 Appareils utilisés pour les manipulations microbiologiques

- Autoclave (Systec 5075 MLV)

-Etuve bactériologique (Memmert)

- Vortex (Heidolph)
- Balance de précision (Sartorius)
- Bain marie
- Loupe binoculaire (Carl Zeiss)
- Plaque chauffante agitant (Fisher)
- Microscope optique (Laboscope 200);
- Micropipette (1000µl (Capp)
- Four Pasteur
- Centrifugeuse
- Incubateur (HERAEAEUS);
- Centrifugeuse max 10000 tours /min (Universal 16 R).

- **Petits matériels et verreries**

Pipettes Pasteur, flacons en verre (de 250 ml), tubes a essais en verre, pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml), boites de pétri en plastique de 90 mm, béciers de 250,500 et 1000 ml, des Erlen myers, burette, anse de platine, cloches de Durham

II. Méthodes analytiques:

II.1. Echantillonnage et prélèvement « matériel biologique »:

Les échantillons du lait proviennent de chèvre saines de deux région (deux prélèvements de lait proviennent de chèvres localisés à région de Sidi Belabbes et deux prélèvement a été effectué à région de Rhelizane) les 4 prélèvements sont appartenant à différents race, ils ont reçu le 18-02-2018, auprès des éleveurs. il faut nettoyer la source de prise (le prélèvement a été fait aseptiquement après que les mamelles ont été désinfecté par l'eau tiède contenant de l'eau de javel 2%); les échantillons sont recueillis dans des flacons en verre de 250 ml stériles, transportés dans des glacières réfrigérées, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Tous les laits ont été analysés dans les 24h.

II.2. tests préliminaire :

II.2.1.test du pH

Les échantillons de lait subit de test physico-chimiques consistant la détermination du PH. La mesure du PH est réalisée par PH-mètre (Inolab MLM). L'électrode de référence pour la mesure de la concentration en ions H⁺ (donc du pH) est l'électrode à l'hydrogène. Celle-ci en platine, spécialement traitée, est immergée dans la solution dont le PH doit être mesuré (LEHNINGER, 1981).

II.2.2. Test de la réductase :

Le test de la réductase permet d'estimer la charge microbienne des échantillons de lait collectés. Son principe est basé sur la décoloration du bleu de méthylène. La rapidité de cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents (LARPENT et al., 1997). Plus l'activité microbienne est forte, plus courte sera la durée de décoloration des Echantillons (RYFFEL, 2006).

II.3. Analyse pri-identification :

II.3.1 Préparation des déluions décimales :

Quatre d'échantillon à analyser (lait cru de chèvre) ont été dilué par la méthode de dilution décimale (10^{-1} à 10^{-6}) dans l'eau physiologique (9‰ Na Cl) (voire l'annexe), La solution mère a été préparée en prélevant 1 ml lait cru de chaque échantillon qui a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile.

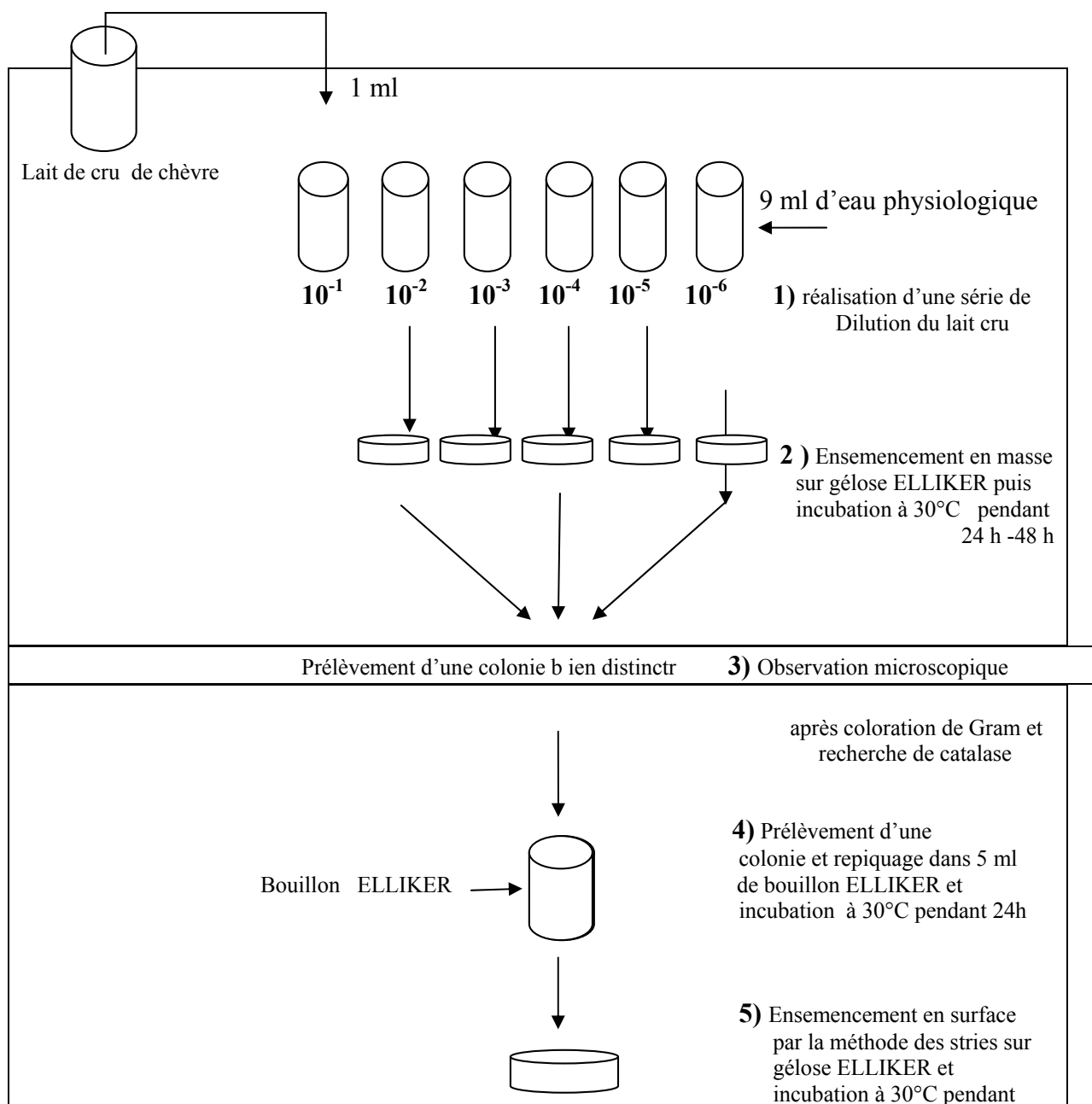
II.3.2 Isolement des bactéries lactiques :

Les milieux de culture utilisés étaient des milieux liquide ou solide de ELLIKER, la stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 120°C pendant 20min, dont nous avons ensemencés 1 ml de chaque dilution par étalement en profondeur.

Les boîtes incubées à 30°C pendant 24H à 48 H.

II.3.3 Purification des isolats :

Après croissance des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse ont été appliqués sur lesquelles des tests préliminaires comprenant la coloration de Gram et le test de catalase (BADIS *et al.*,2006). Seules les souches à Gram positif et catalase négative ont été retenues et repiquée dans milieu ELLIKER liquide puis incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation l'apparition d'un trouble indique la croissance des bactéries, 0.1 ml de chaque tubes positif est ainsi ensemencé par stries sur Elliker solide. Incubation à 30°C pendant 24h. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure, dont La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (Guiraud, 2004).



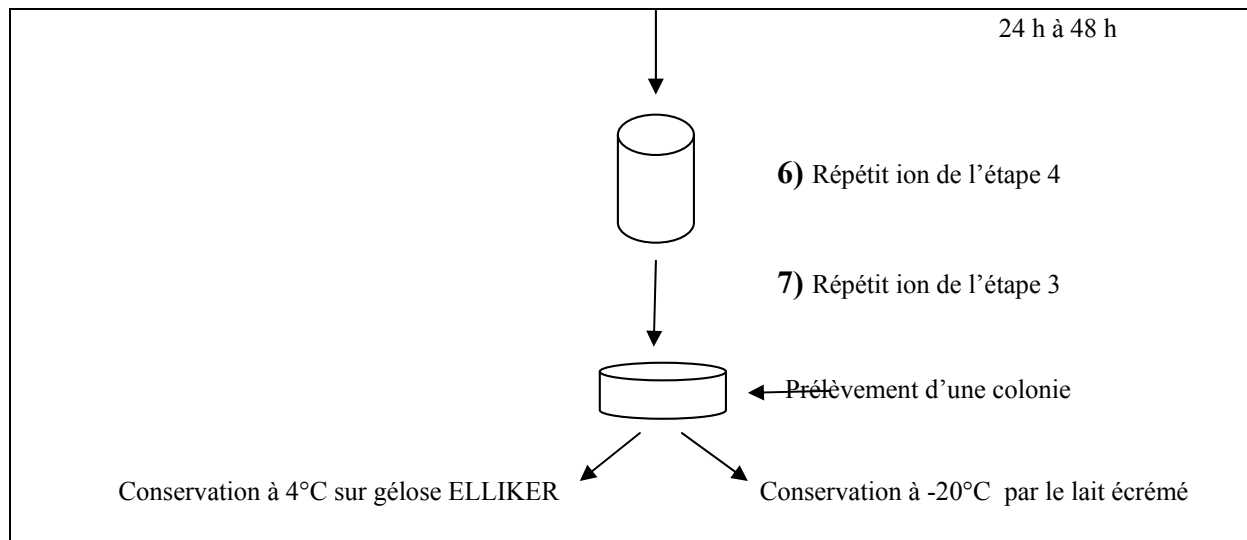


Figure 08: Représentation schématique d'isolement et de purification des lactocoques

II.4. Identification des souches:

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères physiologiques et biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucre.

II.4.1. caractérisation phénotypique des isolats:

II.4.1.1 caractères morphologiques:

- **Étude macroscopique :**

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, couleur, forme, aspect,).

- **Étude microscopique :**

L'observation microscopique au grossissement (G x100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association

- **Coloration de Gram :**

La coloration de GRAM est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries, non seulement d'après leur forme mais aussi d'après leur affinité pour les colorants, liée à la structure générale de la paroi. (SIBOUKEUR, 2011).

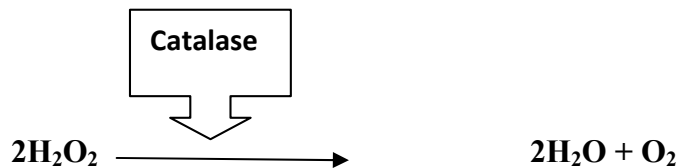
II.4.1.2. Caractères physiologiques et biochimiques :

II.4.1.2.1 Caractères biochimiques :

- **Test de catalase :**

Ce test à pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) et des autres souches non lactiques (catalase +).

Le catalase est un enzyme qui 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 diluée au dixième (sur une lame). La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz et le contraire est négatif (MARCHAL *et al.*, 1991).

- **Type fermentaire :**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. (Hassaine O,2013) Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). De jeunes souches préalablement préparées sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon Elliker, avec une cloche de Durham. Après incubation à 30°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Hariri et al., 2009). Les isolats qui ont produit du gaz dans les cloches ont été notés *hétérofermentaires stricts*; les isolats qui n'ont pas produit de gaz dans les cloches ont été notés *homofermentaires*.

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ a proportions égales (Carr et al., 2002).

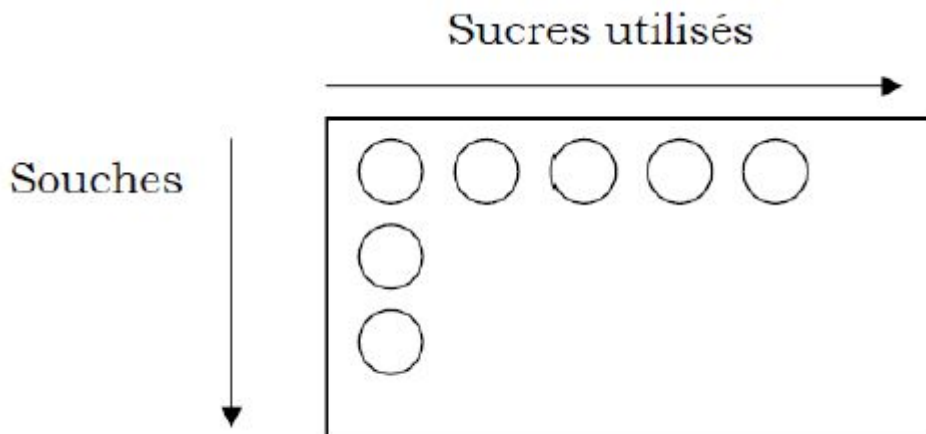
- **Utilisation du citrate :**

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et MC KAY (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé (après 18 h-72 h d'incubation a 30°C). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

▪ **Utilisation des sucres :**

La production d'acide à partir d'un sucre par les isolats lactiques a été attestée de l'utilisation de ce sucre. Après revivification des isolats en milieux Hilliker liquides pendant 24 h à 30 °C, les cellules ont été récupérées sous forme de culot par centrifugation à 400 tours/minute pendant 10 min. Deux lavages successifs du culot avec 5 ml d'eau physiologique stérile ont été réalisés. 10 ml du milieu liquide Hilliker sans sucre ont étéensemencés par 100 µl de la suspension bactérienne précédemment obtenue, puis complétés par quelques gouttes d'une solution aqueuse du sucre à tester (à 10 g l⁻¹) et quelques gouttes d'une solution aqueuse de pourpre de bromocresol (à 0.04 l g⁻¹). Une atmosphère anaérobie a été créée par l'addition d'une couche de paraffine à la surface, Pour chaque milieu utilisé, un témoin sans sucre ensemencé par les souches. Pour les souches des genres *Lactococcus*, les sucres testés sont: glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, raffinose, lactose, sorbitol, mannose, l'amidon, esculine, rhamnose, maltose. puis les tubes ont été incubés à 30 °C pendant 24 h.

L'utilisation du sucre a été notée « + » lorsque le milieu avait viré au jaune. La croissance des souches et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre.



Figur 09: Schéma représentant le mini préparation le test de la fermentation des sucres.

▪ **Test de bleu de Sherman :**

Ce test se fait à évaluer l'aptitude des souches lactiques à décolorer le bleu de méthylène à différentes concentrations dans le lait écrémé (1 et 3%), ce test sert à se différencier entre les lactocoques et les enterocoques.

Donc nous avons préparé deux séries de tubes contenant 9ml de le lait écrémé mélangé avec 1ml de l'indicateur coloré le bleu de méthylène à différentes concentration (1% et 3%) ont été mis dans un tube à essai qui est autoclavés pendant 15 min à 110 °C.

Après refroidissement, les tubes a été inoculé par 0,5 ml d'une culture jeune de l'isolat, incubé à 24h/30°C.

La réaction positive est remarquée par la réduction de bleu de méthylène vers le transparent et coagulation du lait (BENDIMERAD, 2013 ; MAGHNIA, 2011).

▪ L'hydrolyse de l'esculine :

est réalisée pour les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Elle est mise en évidence sur le milieu gélosé à la bile esculine après incubation des cultures à 30 °C pendant 72 h. L'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture.

▪ Hydrolyse de l'arginine :

La recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH) est étudiée sur le milieu M16 BCP (Thomas,1973).

Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et réalcaliniser le milieu (cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine) et par conséquent changer la couleur du milieu du jaune au violet qui est la couleur initiale (Thomas,1973).

II.4.1.2.2 Caractères physiologiques :

▪ Test de croissance à différentes température et de thermorésistance :

La capacité des isolats lactiques à croître entre 10 °C ,40 °C et 45 °C a été testée après les avoirensemencés en strie sur les milieux de cultures gélosés Hilliker, puis les avoir incubés en aérobiose pendant 24h à soit 10 °C, 40°C, 45 °C. La lecture des résultats a consisté à observer à l'oeil nu la présence (résultat positif) ou l'absence (résultat négatif) de colonies à la surface des géloses.

autre série des tubes du bouillonensemencé par une culture jeune à subit un chauffage à 63°C au bain Marie pendant 30 min puis on à incubé à 30°C pendant 24h à 48h (BADIS et al., 2004).

A partir de chaque tube traité on aensemencé un nouveau tube de milieu Elliker et porté à incubation à 28C° pendant 48H. Les isolats qui ont poussé après ce traitement sont considéré comme thermorésistants (Stiles et Holzapfel, 1997).

▪ **Test du Na Cl et du pH :**

Pour le test de NaCl, il nécessite l'emploi de deux milieux Elliker liquides ; l'un contenant 4% de NaCl (4g de NaCl par 100ml de milieu), et le deuxième 6.5 %. Ces milieux ont été incubés à 30°C pendant 24 à 48H. La lecture des résultats a consisté à détecter la présence (résultat +) ou l'absence (résultat -) de colonies à la surface des géloses.

Et l'autre test consiste à préparer un milieu de culture de PH=9.6. Les souches sont ensemencées et incubées à 30 °C de 24 à 48 H

II.5. Caractère biotechnologie :

▪ **Test de production d'acétoïne :**

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (Samelis et al 1994 ; Guiraud, 1998) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30°C. Après 24h et dans un tube on dépose sur cette culture 2ml, Ajouter 5 gouttes du réactif α -naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et Ajouter 5 gouttes d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2) pour assurer la réaction de Voges-Proskauer dite réaction de VP, On agite soigneusement les tubes et on les laisse en contact avec l'air libre pendant 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

▪ **Etude de l'activité protéolytique :**

L'activité protéolytique des bactéries lactique est mise en évidence le milieu PCA additionnée de lait écrémé à 1%,2% et 5% a été coulée puis Les bactéries à tester, issues d'une culture jeune, ont été ensemencées à la surface de ces milieux de cultures par touche. Après incubation à 30°C. L'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

▪ **Etude de l'activité lipolytique :**

Milieu de culture 10 g de peptone ; 5 g de NaCl ; 0,1 de CaCl₂ 2H 2O ; 20 g d'agar. Dans un litre de l'eau distillée le pH 6
2,5 ml de tween 80 est stérilisé séparément puis ajouté au milieu
20 ml du milieu est coulée en boite et après solidification les souches lactiques sont ensemencées par touche ou bien un multi-ensemenseur.

L'activité lipolytique est indiquée par l'apparition d'un précipitât visible , résultant du dépôt des cristaux du sel de calcium formé par la libération des acides gras libérés par les enzymes ou un précipitât autour de la colonie dû à la dégradation complète des sels des acides gras, à l'intervalle régulier de 24H d'incubation à T° 37°C, les boites sont examinées pour un monitoring d'un activité lipolytique.

▪ **Etude de l'activité exopolysaccharide :**

La détection des exopolysaccharides produites par les souches lactiques a été testée après encencement en stries sur la gélose MSE déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 30°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition des colonies larges et galuantes (Hadeif, 2012).

▪ **Etude de l'activité antibactérienne de genre lactococcus (méthode de double couche) :**

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les souches lactocoque ont été encencées en touche (à l'aide d'un inoculateur multipoint stérile) à la surface d'un milieu Helliker solide à partir d'un culture de 24h, les boites sont séchées sous la température ambiante pendant 2h, après 24h d'incubation et la croissance des souches on inocule la deuxième couche de Miller-Hinton semi solide maintenue en surfusion au-dessus de la première couche de gélose . Cela permet de fixer les colonies et d'éviter leur dispensions. Une couche de MH semi solide contenant 100UI d'une culture jeune en milieu liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène) *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *E.coli*.

La lecture des boites s'effecture après 24h d'incubation à 30°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobienne. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

▪ **Etude des cinétiques des souches :**

Les souches étudiées sont les suivantes : C16 ; C10 ;C4 isolées de lait cru de chèvre.

Chaque souche a étéensemencée d'abord sur Helliker liquide et incubée à 30°C pendant 18h, ensuite 0.1 ml de chaque souche de la culture précédente a été inoculé dans 9 tube contenant 10 ml de lait écrème, puis incubé à 30°C pendant 18h,

La cinétique d'acidification et de croissance est réalisée aux intervalles de temps suivants 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48h.

En retirant les tubes de t0 pour lequel les mesures sont effectuées directement , les tubes restant sont incubés à 30°C. Chaque intervalle de temps, chaque tube de chaque souche va être sorti pour suivre le pH, évaluation de l'acidité, et le dénombrement.

Ses mesures se déroulent chaque 2h de la manière suivantes :

- le dénombrement : On fait une dilutions décimales pour chaque tubes jusqu'à 10^{-9} , Les dilutions adéquats (Les trois dernières dilutions de nos échantillons) sontensemencées en profondeur sur 3 boite de Pétri (3 boites par dilution). Seules les boites contenant un nombre de colonies compris en 25 et 250 sont retenues.
- la mesure du pH : A l'aide d'un pH mètre, on détermine le PH de chaque tube (la figure 10 résume les différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification)
- la mesure de l'acidité titrable : Le dosage de l'acidité au cours de croissance des souches dans le lait est mesure chaque fois, en utilisant un statif avec noix et pince, une solution de NaOH, une burette de 25 ml, une pipette de 10 ml et une solution de phénolphtaline à 1% dans l'éthanol. On remplit la burette de la solution de NaOH, on la fixe au statif et on règle le niveaux du liquide à zéro. Les tubes incubés contenant les cultures en lait, sont versé dans un bécher dans lequel sont ajoutées 5gouttes de phénolphtaléine. Le titrage s'effectue sous agitation. On considéré que le virage est atteint, quand la couleur blanche de lait vire à la rese pale et persiste pendant une dizaine de secondes. Les résultats sont exprimés en degrés domic selon la formule suivant: $\text{acidité} = n \cdot 10$

dont n: volume de la souche domic

1 degré domic = $1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g}$ d'acide lactique dans un 11 de lait.

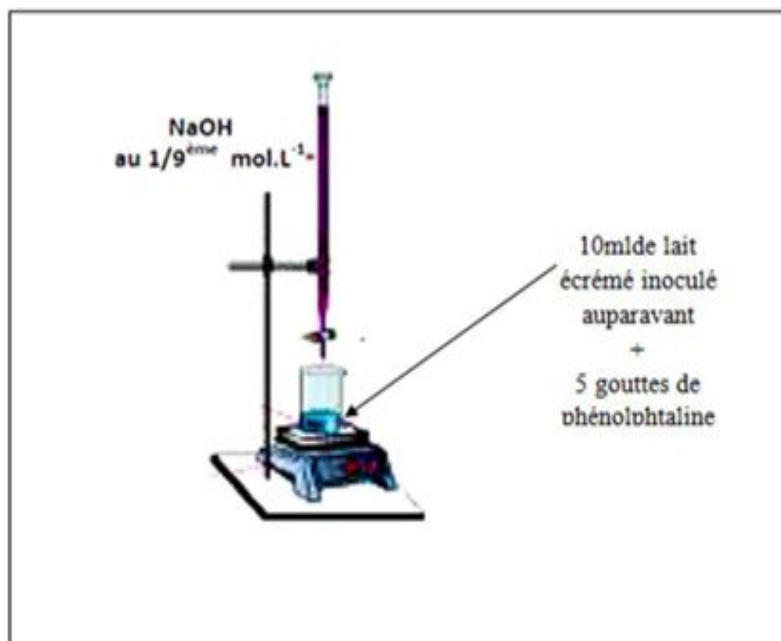


Figure 10: instruments pour la mesure de l'acidité titrable

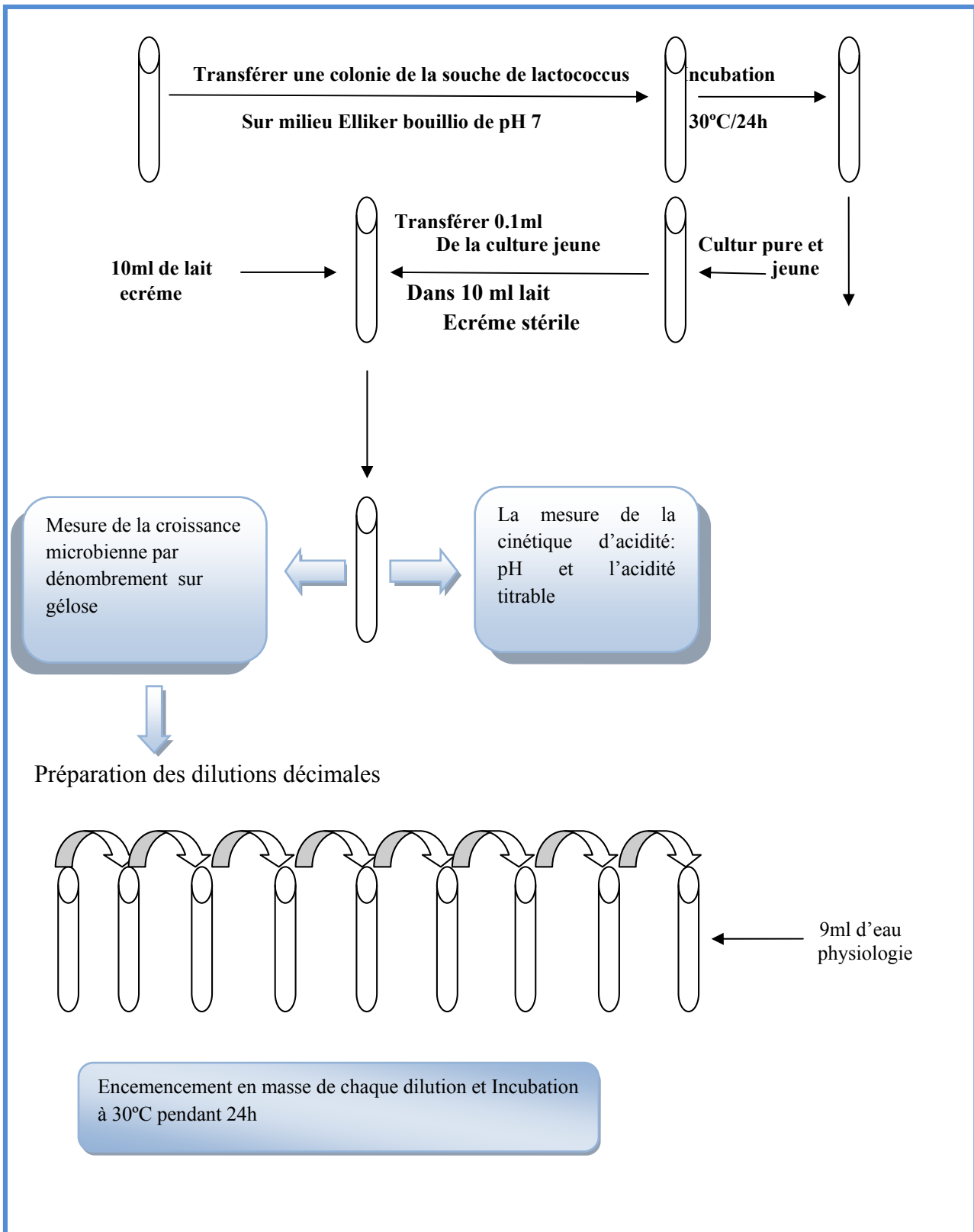


Figure 11 : Représentation schématique du différentes étapes de la cinétique de croissance et d'acidification

II.6 Conservation des souches :

Deux types de conservation sont à noter. Une à courte et l'autre à longue durée.

6-1-Conservation courte durée :

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide Hilliker incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (Badis et al, 2005).

6-2-Conservation longue durée :

A partir des cultures de 18h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot.

Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé enrichi avec l'extraitnde levure, deux fois avant l'utilisation (Badis et al, 2005).

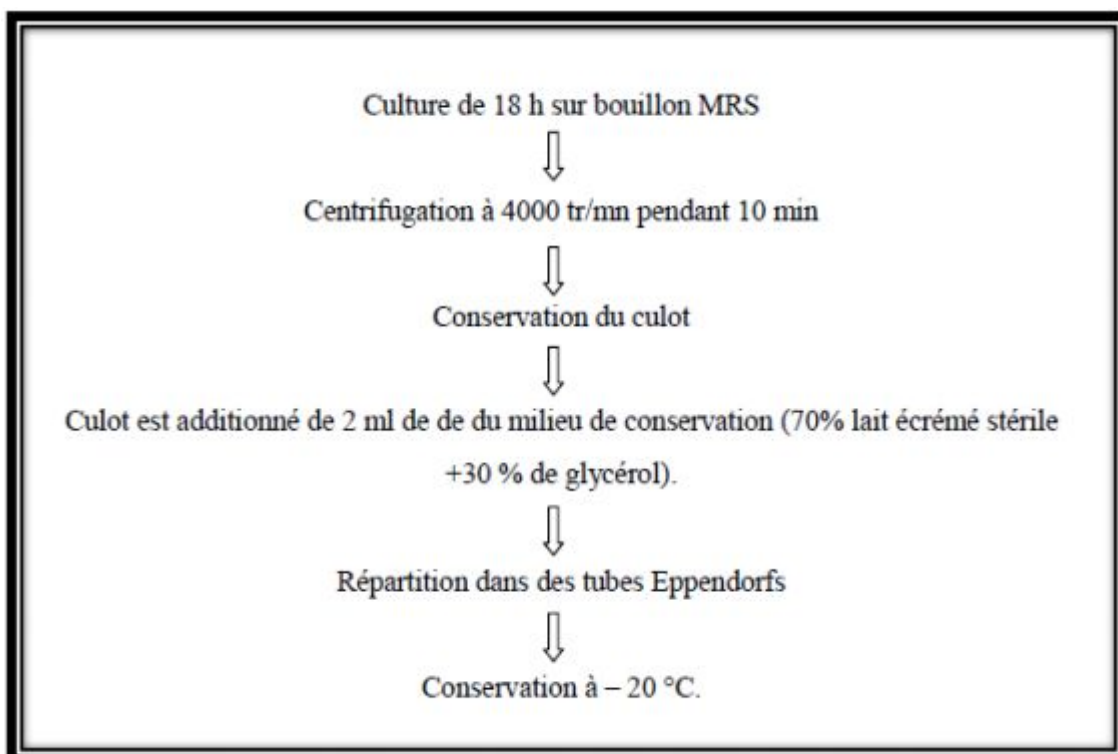


Figure 12 : Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi et al, 2002)

RESULTS ET
INTERPRETATIONS

1. Test du reductase et du pH:

- On a obtenue un PH =6.5 c'est un PH plus au moins acide, l'acidification du lait jusqu'à sa coagulation se faite par l'activité des bactéries lactiques autochtones, l'acidification due a la fermentation des sucres par les BL (El BARADEI *et al.*, 2008).
- La décoloration du bleu de méthylène par le lait analysé a eu lieu après une durée supérieure à 4 heures. Ce lait est par conséquent de bonne qualité bactériologique. Il renferme moins de $2 \cdot 10^6$ germes /ml (LARPENT, 1970 ; GUIRAUD ,1998). La décoloration du bleu de méthylène est due au métabolisme bactérien et sa rapidité est directement proportionnelle au nombre de germes.

Tableau 11: Tableau récapitulatif des résultats du test de la réductase et de pH.

Les échantillons	Temps de décoloration au bleu de méthylène	pH
Ech1	4hmin	6.8
Ech2	4h35min	7
Ech3	4h30min	6.1
Ech4	5h15min	6.5

2. Isolement et purification des souches :

A partir des 4 échantillons du lait cru de chèvre, on a isolé *Lactococcus* sur milieu Elliker solide. La purification des souches isolées par plusieurs repiquages successifs sur milieu Elliker (alternant sur milieux liquide), les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes, ils ont été gardées pour la suite de l'étude (**Figure 13**).

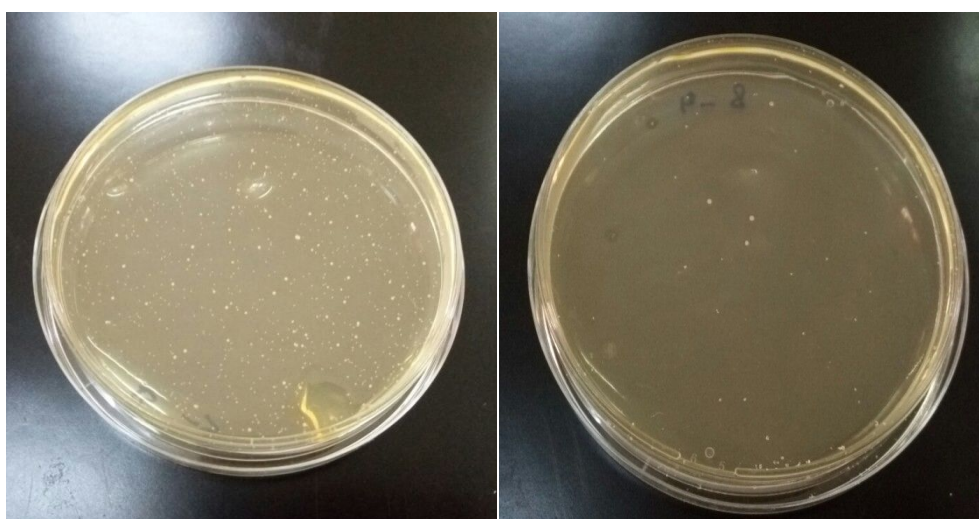


Figure 13 : Isolement de *Lactococcus* sur milieu Elliker



Figure 14 : Purification de *Lactococcus* sur milieu Elliker

Après purification de ces colonies ; nous avons procédé à leur identification

3. Identification des souches :

A partir de 4 échantillons du lait cru de chèvre, nous avons isolé 60 isolats ayant un profil homofermentaire à Gram positif, à catalase négative à partir desquels 40 isolats cocci ont été retenus, parmi cette collection des coques on se basait sur les résultats du test de bleu de Sherman, seulement 16 isolats représentatifs de la flore dominante ont été identifiés de manière complète par les méthodes phénotypiques.

Au total, 40 isolats ont été identifiés ont montré une capacité de croître à 10°C et à 40°C mais pas à 45°C présentant une hémolyse γ , quelques isolats se développent sur lait de Sherman 0.1% et 0.3% et ainsi que dans un bouillon hypersalé à 4%. Ne se développent pas à pH 9,6 ne poussent pas à 6,5% NaCl et elles ne survivent pas après un traitement de thermorésistance, on les a attachés au genre *Lactococcus*.

Par rapport au test de l'ADH, la production d'acétoïne, hydrolyse de l'esculine l'utilisation de citrate et le profil fermentaire des sucres, ils ont été subdivisés en espèces et sous-espèces : (Badis., 2004; Dicks *et al.*, 1993; Hammes *et al.*, 1992; Holzapfel et Schillinger 1992; Harrigan et Mc Cance, 1976).

Les isolats se sont montrés tous homofermentaires Absence du gaz dans la cloche signifie que ne produisant pas le CO₂ à partir du glucose par la souche testée cela indique le type fermentaire est homofermentaire.

3.1. caractérisation phénotypique des isolats :

3.1.1. caractères morphologiques :

- **étude macroscopique :**

L'observation macroscopique des cultures sur les géloses, révèle la présence des colonies de petite taille, blanches, ou crémeuses, lenticulaires ou circulaires, brillantes, ne présentant pas un aspect filamenteux, parfois, les bords de certaines colonies sont plus claires et éblouissantes (Figure 13 et 14).

Seules les bactéries Gram positive et catalase négatif qui se présentent sous forme en coques isolées, en paires ou en chaînettes sont retenues.

Les colonies ne présentaient pas une grande hétérogénéité morphologique, sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

L'aspect des colonies visqueuses signe à la production du dextrane sur Elliker lactosé utilisé pour la purification des bactéries lactiques.

- **étude microscopique :**

L'examen microscopique fournit des renseignements concernant la morphologie des bactéries (cocci, bacilles, spirales, à bord parallèles ou non à extrémités arrondies ou effilées...). ainsi que leur taille. La coloration de Gram de les classer en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, ainsi que d'observé des arrangements particuliers (diplocoques, palissades, chaînettes, tétrades....).

Dans notre recherche, l'observation microscopique a révélé une forme de cellules majoritaire qui est la forme cocci. Ces coques sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues ou bien isolées. Une forme de bacilles dispersés.

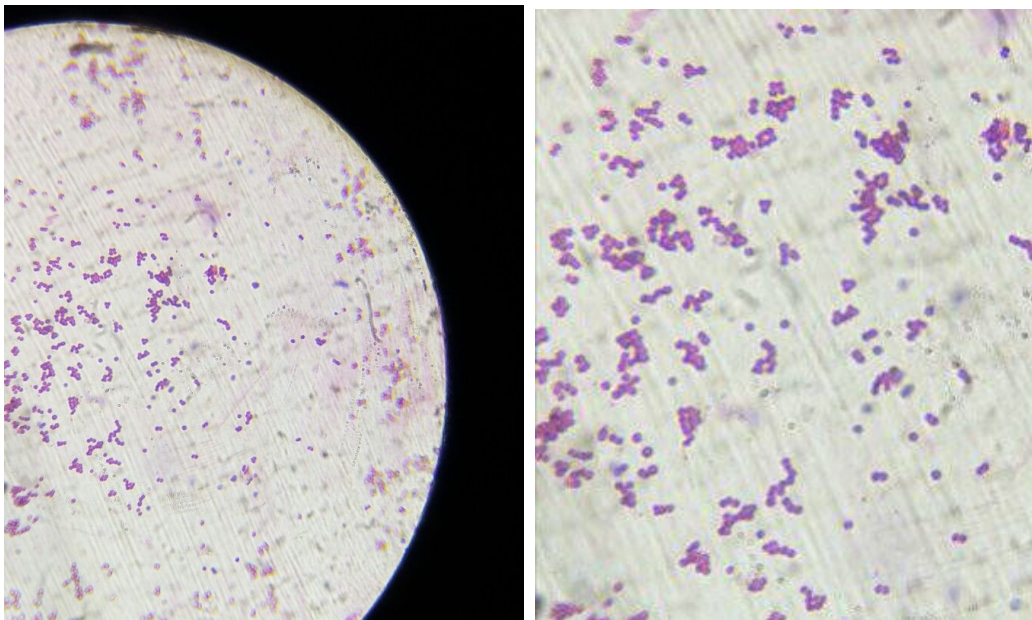


Figure 15: Aspect microscopique de *Lactococcus*

3.2 caractères physiologiques et biochimiques :

3.2.1. caractères biochimiques :

- **Test de la catalase :**

Ce test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par **Prescott *et al.*, (2003)** et consiste à mettre une colonie prélevée dans l'eau oxygénée, le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase qui signifie que le tests est positif.

D'après ce test, les souches purifiées présentent une catalase négative. Ce caractère indique l'appartenance des bactéries lactiques au genre *Lactococcus* (bactéries à Gram+ aérotolérantes, ne possèdent pas de système respiratoire ni cytochrome, ni catalase) (**DESMAZEAUD et DE ROISSART, 1994**)

- **Type fermentaire :**

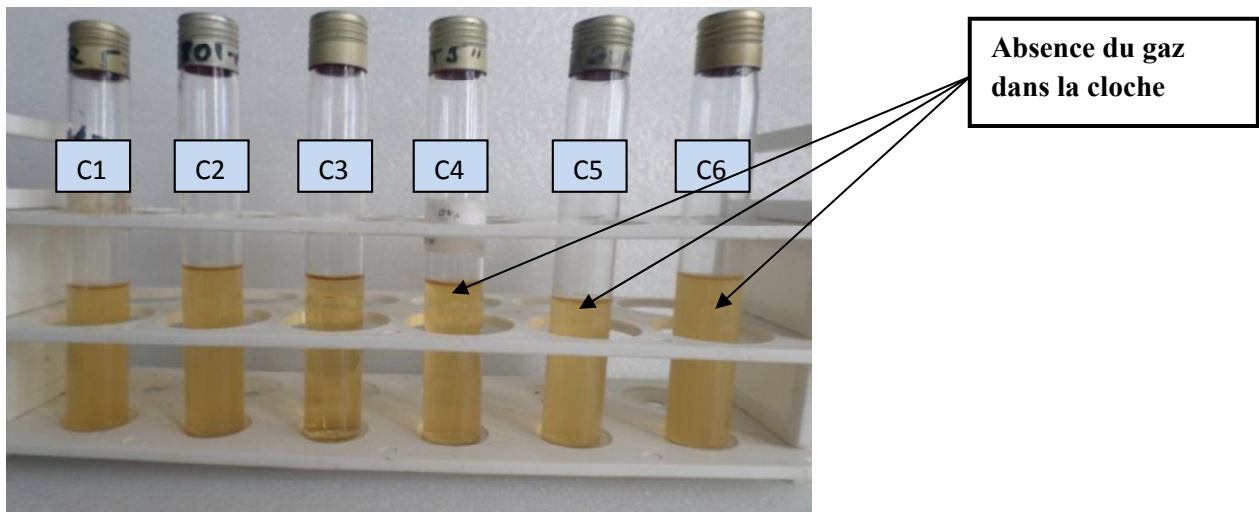


Figure 16. Résultat de type fermentaire des isolats.

▪ L'utilisation de citrate :

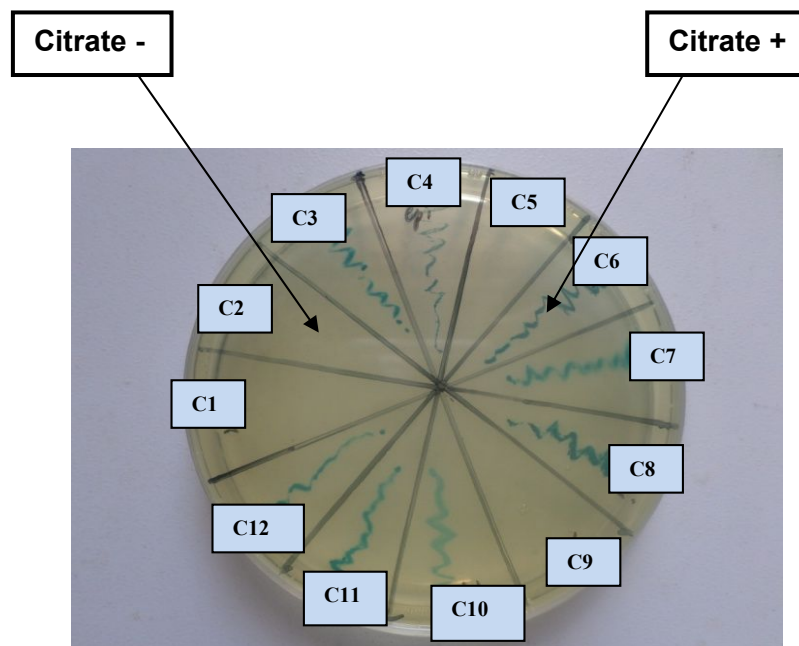


Figure 17. Test de réduction de citrate sur milieu KMK.

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car chez ces bactéries le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO₂, participant aux qualités aromatiques et texturales des produits en agro-alimentaires (Raynaud *et al.*, 2003).

▪ Profil fermentaire des sucres

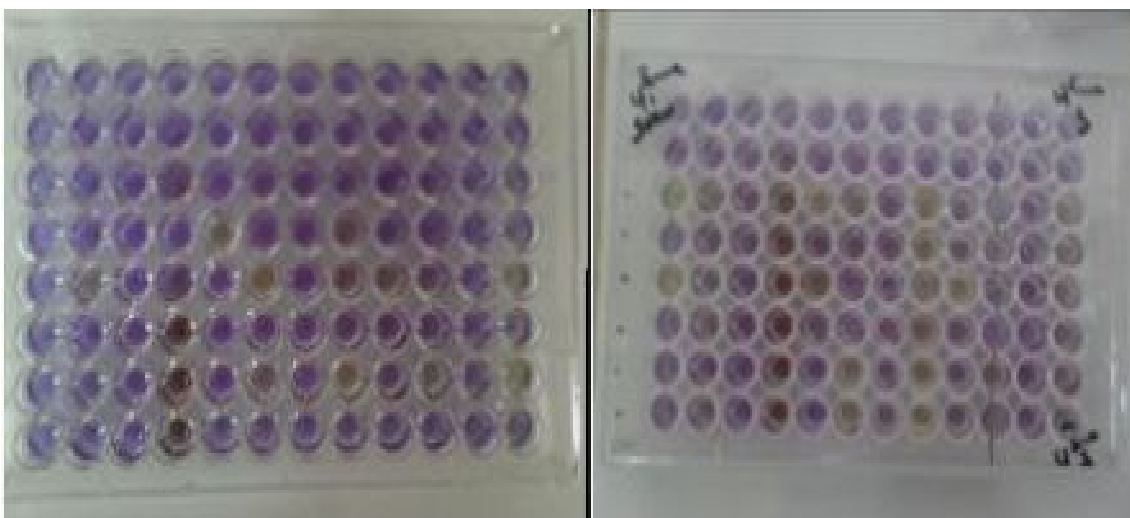


Figure 18. Résultats du test de sucre des isolats.

Tableau 12. Profile fermentaires des isolats du genre présumé *Lactococcus* sp.

Résultat et interprétations

Sucres souches	Mannitol	raffinose	Amidon	Lactose	D-xylose	Sorbitol	Arabinose	Maltose	fructose	Rhamnose	Saccharose	esculine	Souches identifiées
C1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>plantarum</i>
C2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
C3	+	-	-	+	+	+-	+	+	+-	+-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
C4	-	+-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	V	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Plantarum</i>
C5	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>
C6	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+-	+	+	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
C7	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
C8	-	+	V	-	+	+	+	+	V	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
C9	+	+	-	+	+	+	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
C10	+	-	-	+	-	-	+	+	V	V	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
C11	-	+-	-	-	+	+-	+	+	+-	+-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C12	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
C13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>plantarum</i>
C14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>plantarum</i>
C15	-	+	-	+	+-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
C16	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lacti</i>

▪ Lait de Sherman :

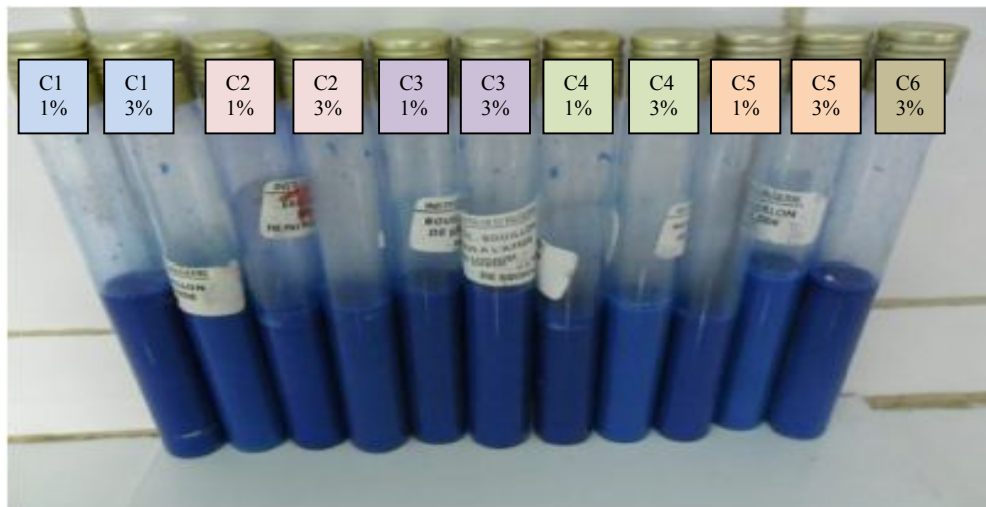


Figure 19: Résultats de test Sherman à 1% et 3% (Lactocoques)

Après l'incubation, quelque isolat pousse sur le lait de Sherman 1% et 3% de bleu de méthylène et aucune croissance n'a été constatée sur le lait à 1% et 3% de bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène est d'une couleur bleue en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit, ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ce sont des micro-aérophiles, il ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilise tous l'oxygène de bleu de méthylène (Larpent *et al* 1990), l'obtention d'un calai blanc s'explique par l'augmentation de la charge bactérienne.

• Dégradation de l'esculine :



Figure 20. Résultat de la dégradation de l'esculine sur BEA.

- Hydrolyse de l'arginine :

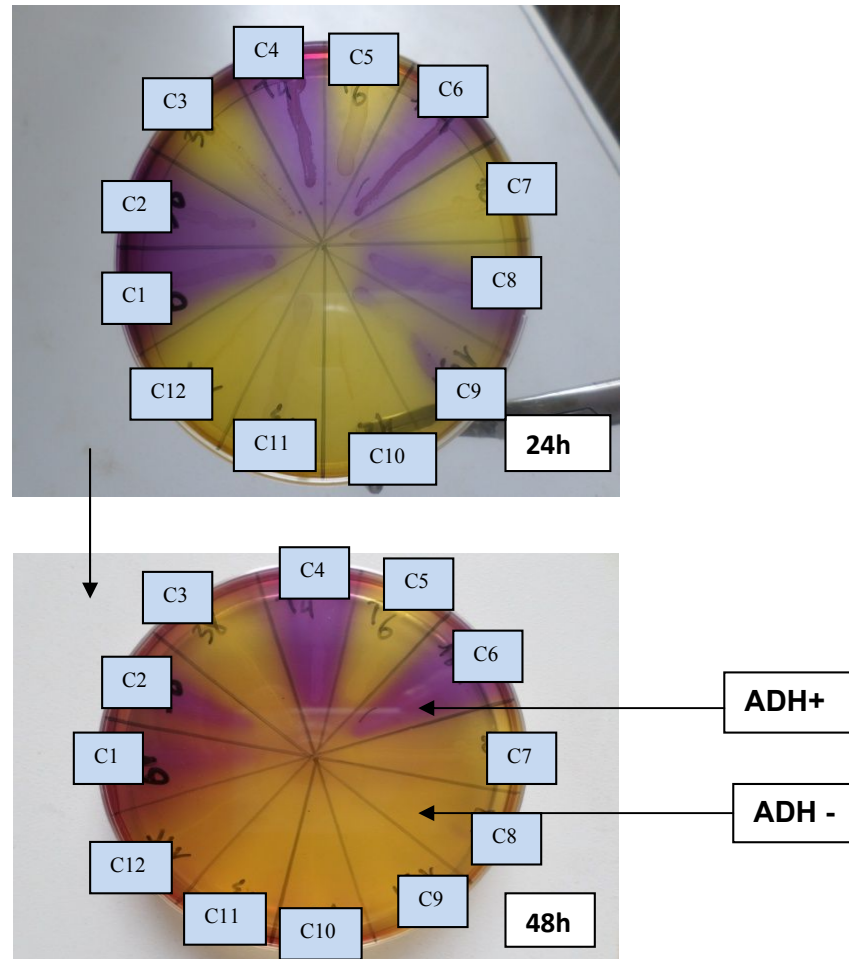


Figure 21. La mise en évidence de l'enzyme arginine dihydrolase (ADH).

3.2.2 caractères physiologiques :

- Test de la thermorésistance et test de croissance à différentes température:**

Pour la thermorésistance, Absence de trouble pour tous les isolats testés, tous les isolats n'ont pas réussi à survivre après ce traitement de thermorésistance.

Pour le test croissance à différentes température, La croissance est mise en évidence par l'apparition d'un trouble dans le milieu liquide.

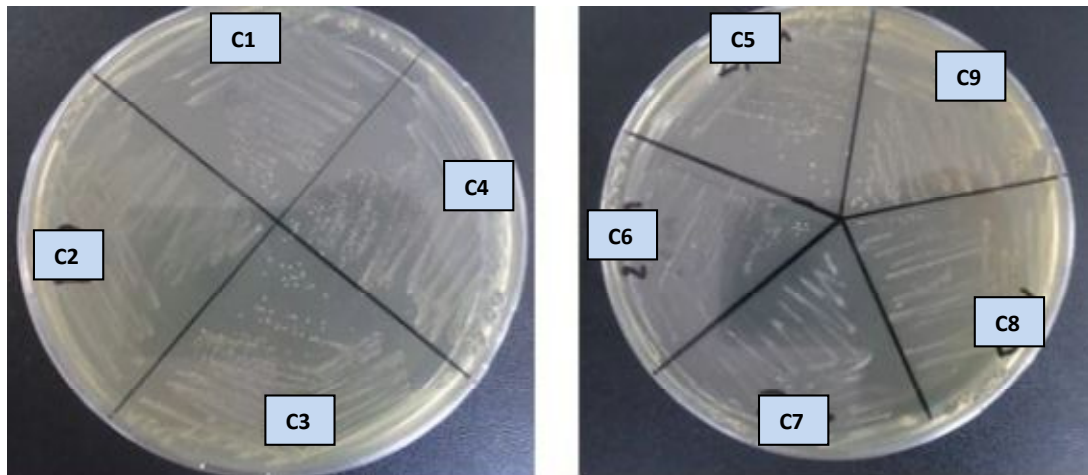


Figure 22 . Résultat du test de croissance à 10°C

▪ Test du NaCl et de pH :

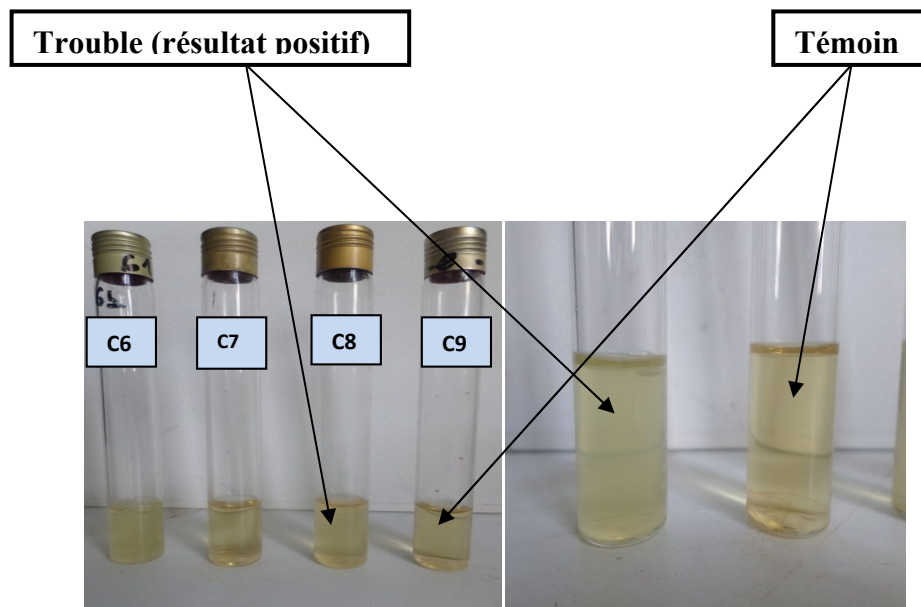


Figure 23. Résultat du test de résistance sur milieu hypersalé (4% NaCl).

Pour le test de résistance sur milieu hypersalé de 6.5% de NaCl, Aucune croissance des isolats purifiés n'a été constatée.

Trouble microbien (résultat positif)

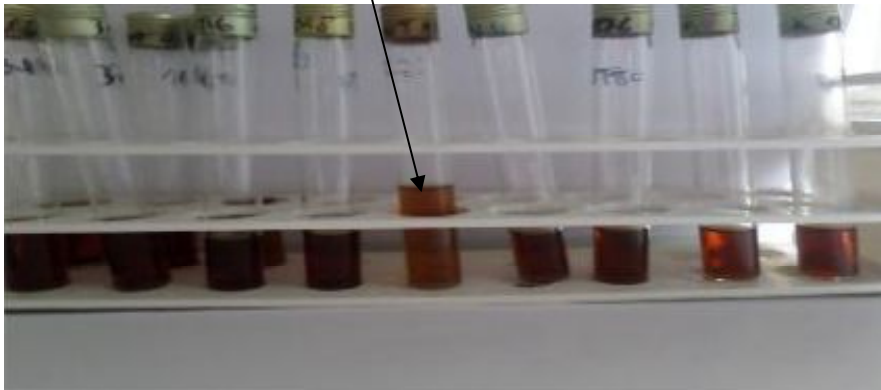


Figure 24. Résultat de la résistance des isolats à pH 9,6.

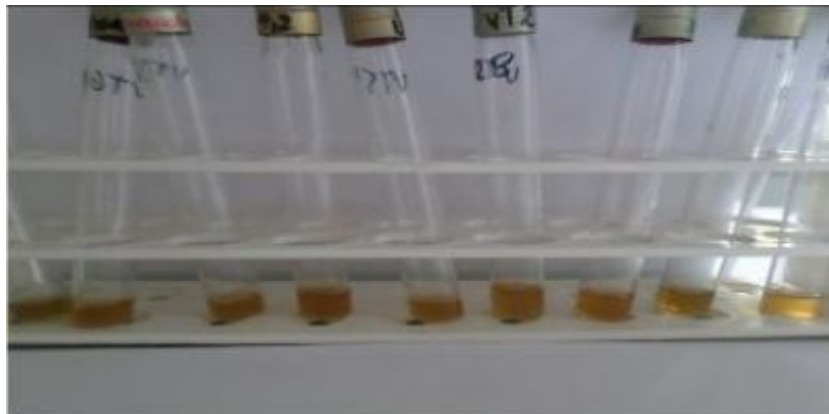



Figure 25. Résultat de La croissance des isolats sur milieu Elliker pH 4.


Tableau 13. Critères biochimiques et physiologiques des espèces des bactéries lactiques du genre présumées *Lactococcus* isolées du lait cru de chèvre

Tests isolats	Gram	forme	Type fermentaire	B.M		ADH	ACT	CTR	NaCl		T°				pH	
				1%	3%				4%	6.5%	10°C	40°C	45°C	RES	pH4	pH9.6
C1	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
C2	+	Coqu	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C3	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
C4	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
C5	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
C6	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+-	-	-	+	-	-	-	-	-
C7	+	Coqu	H.F	V	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C8	+	Coqu	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C9	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
C10	+	Coqu	H.F	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
C11	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C12	+	Coqu	H.F	+-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C13	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	V	-	-	+	-
C14	+	Coqu	H.F	-	-	-	+	-	+	-	+	+-	-	-	+	-
C15	+	Coqu	H.F	V	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C16	+	Coqu	H.F	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-


ADH : production de l' arginine dihydrolase. **ESC** : hydrolyse de l' esculine. **ACT** : production d' acetoïne. **CTR** : dégradation de citrate. **RES** : thermorésistance à 60,5 °C pendant 30 min. **GAZ** : production de gaz à partir du glucose. **%** : concentration de NaCl.

 : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

 : *Lactococcus plantarum*

 : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

 : *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*

 : *Lactococcus raffinolactis*

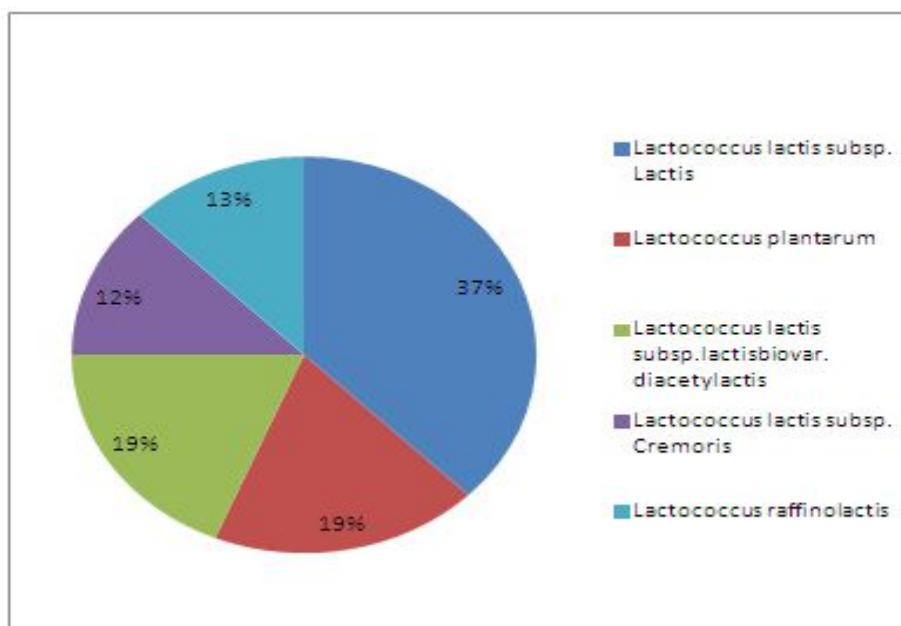


Figure 26: diagramme du pourcentage des principales espèces de Lactococcus isolées à partir de lait de chèvre.

4. Résultat de Caractère biotechnologie :

- **Activité aromatisante :**

La production des composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés.

Après application du test VP; l'apparition d'un anneau rose ou virage du milieu vers le rose indique une réaction positive. Si le milieu reste jaune, la bactérie est incapable de produire l'acétoïne.

Selon les résultats obtenus, la plupart des souches testées sont aromatisantes avec production d'acétoïne par la voie butylène glycolique.

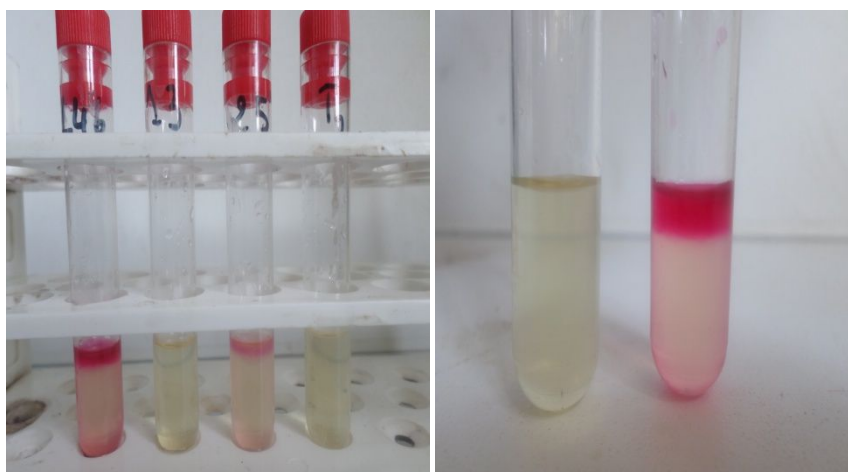


Figure 27. Test de la production d'acétoïne.

▪ étude de l'activité protéolytique :

Pour mettre en évidence l'activité protéolytique des souches étudiées ces dernières sont ensemencées par touche sur milieu PCA au lait solide à différents concentrations de lait écrémé 1, 2 et 5 % après l'incubation de 24h à 30°C les diamètres des halos claires apparus autour de chaque colonie sont mesurés.

Les résultats ont montré dans les figure (28)

Les souche lactique testées possèdent une capacité importante à dégrader les caséines trouvées dans le milieu de culture utilisé et présentent une croissance avec une activité protéolytique bien déterminée par la formation d'un halo

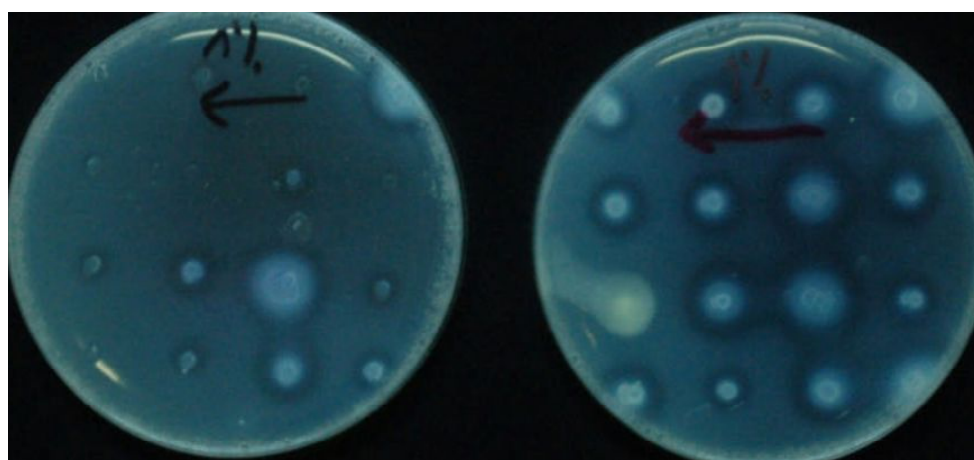


figure 28: résultats de l'activité protéolytique

▪ étude de l'activité lipolytique :

L'activité lipolytique de nos souches a été déterminées selon le méthode de Guessas et al 2012 sur milieu agar au tween 80 comme source artificielle et au l'huile d'olive comme source naturelle

L'activité lipolytique est indiquée par l'apparition d'un précipitât visible résultant du dépôt des cristaux du sel de calcium formé par la libération des acides gras libérés par l'enzyme ou un précipitât clair autour de la colonie dû à la dégradation complète des sels des acides gras. Après incubation de 24h à 30°C les diamètres des zones claires apparues autour des colonies sont mesurés

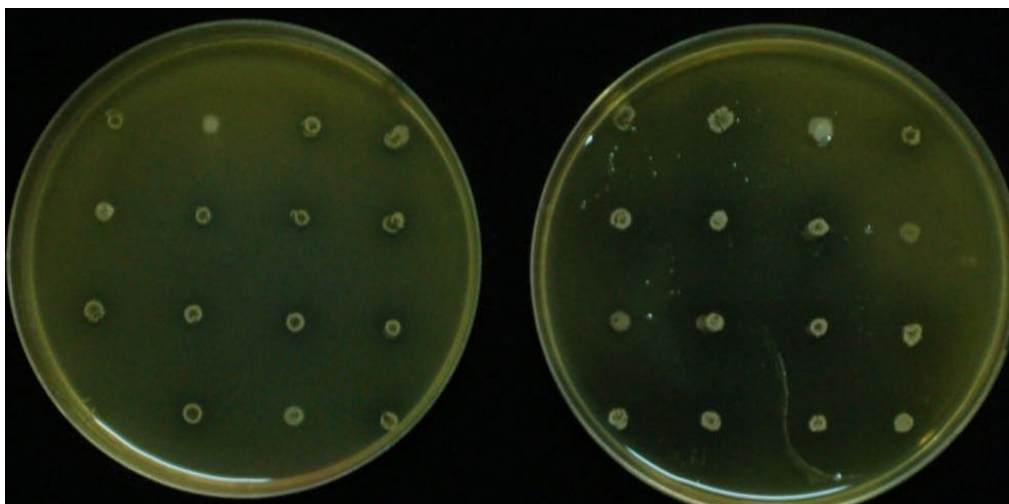


figure 29: résultats de l'activité lipolytique sur milieu agar au l'huile d'olive(gauche) et au tween 80(droite).

Tableau 14: l'Activité protéolytique et lipolytique

Souches	Activité protéolytique (%)	Activité lipolytique	
		Tween 80	H.O
C1	+	0	+
C2	+++	++	+++
C3	+++	+	++
C4	+++	++	+++
C5	++	+	+
C6	++	+	++
C7	+++	+	+++
C8	+++	++	++
C9	++	+	+
C10	++	++	+++
C11	+++	+	++
C12	++	+	++
C13	+	0	+
C14	++	++	++
C15	+++	++	+++
C16	+++	+	++

Pour la protéolyse : 0: absence d'un halo d'hydrolyse; +: halo < 10mm; ++ : halo de 10 mm à 20 mm; +++: halo > 20mm.

Pour la lipolyse : 0: absence d'un halo d'hydrolyse; +: Diamètre de l'halot < 5mm; ++ : Diamètre de l'halot de 5 mm à 10mm; +++: Diamètre > 10mm.

▪ **étude de l'activité exopolysaccharide :**

Les résultats de production des exo-polysaccharides par les isolats lactiques sont illustrés dans la tableau ci-dessous(15)

Tableau 15 : production des exopolysaccharides par les bactéries lactiques

Espèce	Observation	Evaluation du test
C1	Colonies normales	-
C2	Colonies normales	-
C3	Colonies larges et gluantes	+
C4	Colonies normales	-
C5	Colonies normales	-
C6	Colonies normales	-
C7	Colonies normales	-
C8	Colonies larges et gluantes	+
C9	Colonies normales	-
C10	Colonies larges et gluantes	+
C11	Colonies larges et gluantes	+
C12	Colonies larges et gluantes	+
C13	Colonies larges et gluantes	+
C14	Colonies larges et gluantes	+
C15	Colonies larges et gluantes	+
C16	Colonies larges et gluantes	+



Figure 30 : Aspect des colonies sur milieu MSE

Le phénomène le plus favorable à des nombreux processus industriels alimentaires est la production des EPS par les bactéries lactiques (Walling et *al*, 2001).

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour les produits transformés, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (Cerning, 1990).

Selon de nombreux auteurs, la production d'EPS dépend, principalement, de la souche, du taux de croissance, de la température d'incubation, du milieu de culture, de la vitesse d'acidification, du pH et de la quantité d'oxygène requis dans le milieu de culture (Latreche, 2016)

▪ **étude de l'activité antibactérienne de genre lactococcus (méthode de double couche) :**

Les résultats d'interaction des souches des lactococcus isolé avec la souche cible *Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* ont permis de retenir 16 isolats dont les zone d'inhibition qui ont été produites sur milieu Elliker sont illustré dans le tableau ci-dessous

<i>s. pathogènes</i> <i>s. lactiques</i>	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Pseudomonas</i> (mm)
C1	9	13	10
C2	6	9	12
C3	6	8	13
C4	11	10	15
C5	10	9	10
C6	7	7	12
C7	8	8	11
C8	10	8	11
C9	10	7	13
C10	10	10	14
C11	7	8	13
C12	7	7	14
C13	9	7	10
C14	8	9	12
C15	8	8	11
C16	12	13	15

Tableau 16 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches de *Lactococcus vis-à-vis Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*.

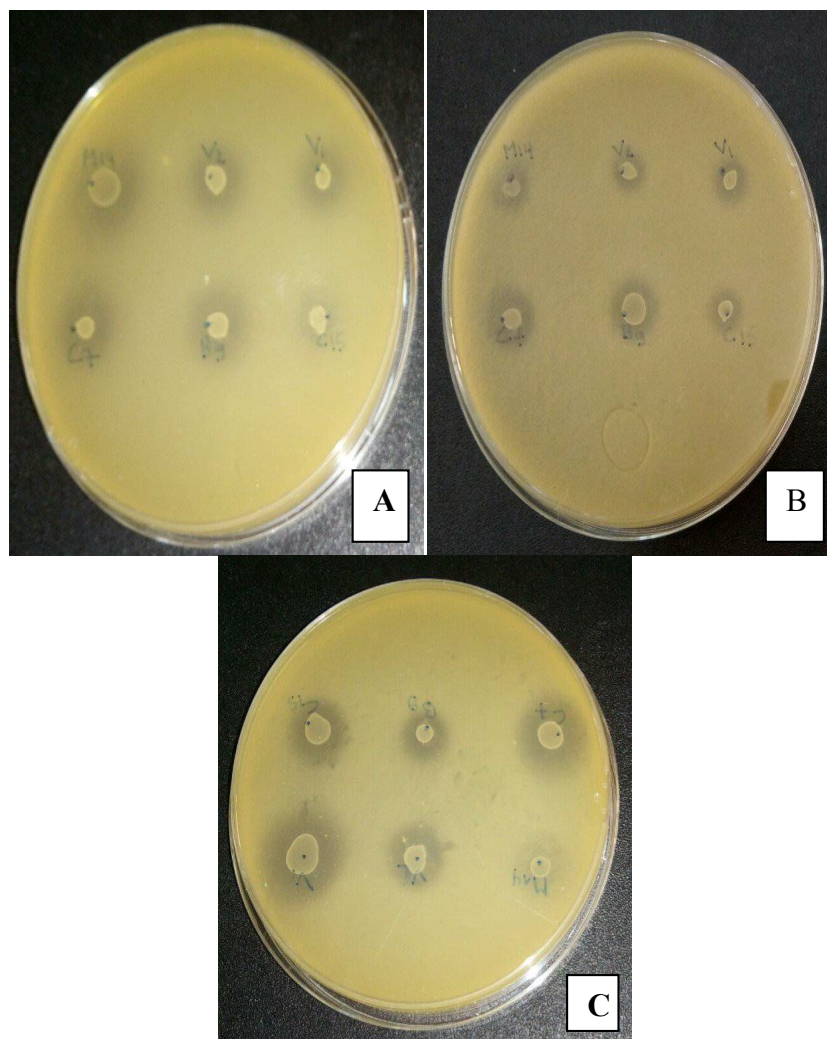


Figure 31: résultat de l'activité antibactérienne de genre lactococcus vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B) et *Pseudomonas* (C)

- **Etude des cinétiques des souches (C16, C10, C4) :**

- A. Pouvoir acidifiant :**

Afin de sélectionner des souches lactiques intéressantes du point de vue technologique, l'étude du pouvoir acidifiant s'est avérée importante. Elle est évaluée par le suivi de l'acidité Dornic d'un lait écréméensemencé par une souche pure de *Lactococcus lactis* à 30°C pendant les intervalles du temps suivant : 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48 heures.

Les résultats de la production d'acide lactique et les valeurs du pH des souches (C16, C10, C4) étudiées pendant 48 h sur milieu lait écrémé, nous a permis d'avoir les représentations graphiques ci-dessous **Figure (32)**. Les valeurs trouvées montrent des variations plus ou moins importantes entre les différentes sous espèces elles varient entre 13 et 30°D à 0 h et restent presque inchangées après 3 h d'incubation ce qui s'explique par l'adaptation des souches aux conditions du milieu (phase de latence).

Les sous espèces de *Diacetylactis* sont faiblement acidifiants et l'acidité Dornic reste inférieure à 50°D après 48 h d'incubation. (**Figure 32**).

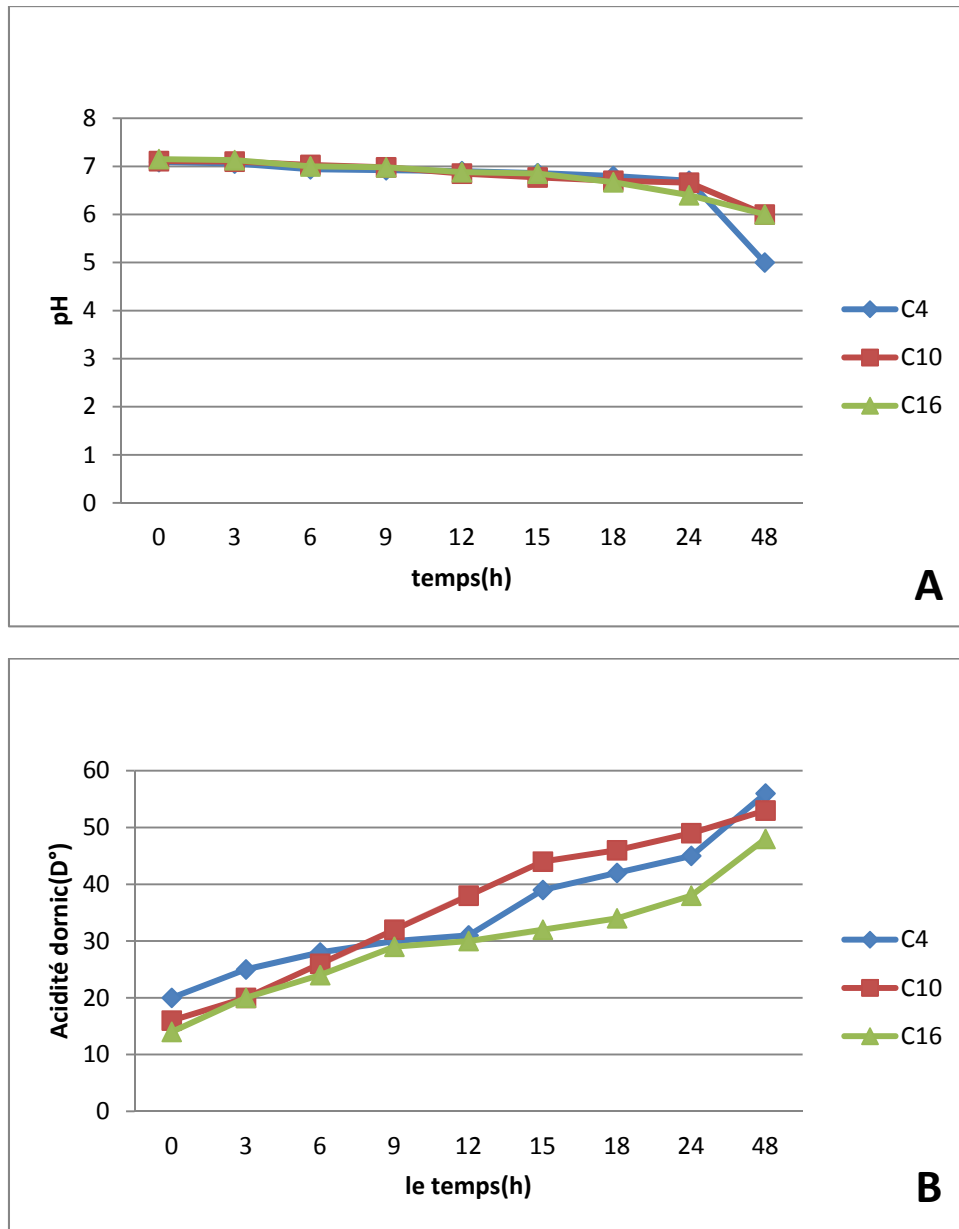


Figure 32: Les cinétiques d’acidifications, l’évolution de l’acidité titrable (B) , l’évolution de pH (A), des souches (dans lait écrémé).

B. Evolution de la biomasse :

La croissance bactérienne est suivie par dénombrement sur milieu solide Elliker lactosé.

Tableau 17: résultats des taux de croissance des souches étudiées.

souches	μh^{-1}	G
C4	1,62	25min
C10	0,56	74min
C16	2,79	14min

G : temps de génération

μh^{-1} : taux de croissance spécifique

L'évolution de la croissance des souches durant 48h de fermentation nous a permis de distinguer les différentes phases de croissance de ces bactéries, où on remarque que la phase de latence ne figure pas dans la courbe cela est due au fait que nos souches se sont adaptées rapidement au milieu dans laquelle elles sont cultivées, qui se reflète par une phase de latence trop courte, un caractère très recherché en industrie laitière permettent un meilleur rendement et une meilleure productivité.

Un taux de croissance de 2.79 μh^{-1} est atteint par la souche C16.

Le calcul du temps de génération montre que la souches se multiplient plus rapidement chaque 14min.

Alors que les autres C4 et C10 ont marqué leurs croissances respectivement par des taux de croissances suivants : 1,62 et 0,56 μh^{-1} .

Des valeurs de taux de croissance beaucoup moindres ($\mu < 0,07 h^{-1}$) sont obtenues après 24h de croissance indiquant de la phase stationnaire (phase de décélération).

La souche de *Lactococcus* C10 a atteint une valeur de taux de croissance plus faible comparée aux autres souches

Les cinétiques de croissances des souches (C4, C10 et C16) sont représentées dans la figure suivante :

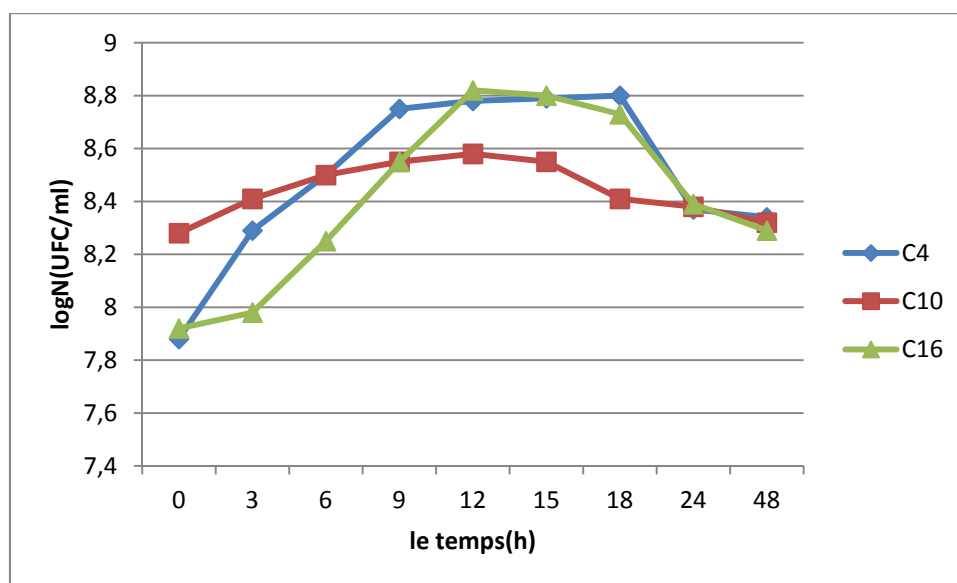


Figure 33. L'évolution de la biomasse sur milieu Elliker lactosé des souches dans le lait écrémé.

DISCUSSION
GENERALE

Notre pays a une tradition bien établie sur les produits laitiers, transmise d'une génération à une autre à travers des siècles. Le lait, abondant durant certains moments de l'année, est facilement périssable et difficile à conserver, singulièrement dans les zones à climat très chaud, alors il a été toujours traité pour augmenter la durabilité et la valeur nutritive pour une consommation domestique et en même temps de permettre la commercialisation du surplus (Bencharif, 2001).

La technologie laitière utilisée dans la fabrication du produit repose essentiellement sur la fermentation avec les bactéries lactiques en tant que barrière pour empêcher la croissance de micro-organismes pathogènes ou de décomposition (Benkerroum, 2013). Ces bactéries lactiques sont généralement reconnues comme sûres (GRAS) en raison de leur longue histoire de consommation sûre par l'homme, et sur le fait qu'elles ont rarement été associés à des intoxications alimentaires ou des maladies infectieuses (Hammes et Tichaczek, 1994).

Pour savoir quels sont les facteurs qui caractérisent nos produits, pour améliorer la technologie de production, identifier les bactéries impliquées dans le processus de fermentation, nous avons pris quatre échantillons de laits de chèvres, afin d'isoler et identifier les souches du genre *Lactococcus* et étudier leurs caractères technologiques, dans le but d'obtenir des souches performantes pour les utiliser en industrie alimentaire.

Dans notre travail de recherche, l'identification phénotypique, biochimique et physiologique des lactocoques montre une diversité importante d'espèces du genre *Lactococcus*.

La distribution des espèces en pourcentages expose la dominance de l'espèce *Lactococcus lactis subsp. Lactis* avec un pourcentage de 37% ; puis *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* (19%), ensuite arrivant *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* et *Lactococcus raffinolactis* (12%).

Au total, 16 isolats ont été identifiés et ont montré une capacité de croître à 10°C et 40°C mais pas à 45°C, présentant une hémolyse, et seulement quelques isolats se développent sur lait de Sherman 0.1% et non sur 0.3% ainsi que dans un bouillon hypersalé à 4%. Par ailleurs, ils ne se développent pas à pH 9,6, ne poussent pas à 6,5% NaCl et ne survivent pas après un traitement de thermorésistance, on les a attachés au genre *Lactococcus*.

Par rapport au test de l'ADH, la production d'acétoïne, **l'hydrolyse de l'esculine** et l'utilisation de citrate et le profil fermentaire des sucres, les souches sont

subdivisés en espèces et sous-espèces (Mc Cance et Harrigan, 1976; Hammes *et al.*, 1992; Holzapfel et Schillinger 1992 ; Dicks *et al.*, 1993 ; Badis., 2004).

Les deux souches C4 et C11, sont ADH-, ne produisent pas d'acétoïne, ne dégradent pas le citrate, ne poussent pas à 4% d'NaCl, poussent à 40°C et **hydrolysent l'esculine**, fermentent le mannitol, le D-xylose, ne fermentent pas le raffinose ni le ribose. Ces souches peuvent s'apparenter à *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* (Guessas et Adjoudj., 2012 ; Hadeif, 2012 ; Badis *et al* 2014).

Certaines isolats sont ADH+, ne produisent pas l'acétoïne, ne réduisent pas le citrate, poussent à 40°C, résistent à 4% de NaCl, **hydrolysent l'esculine**, leur profil fermentaire montre que ces souches(C2.C7.C8.C12.C15.C16) fermentent majoritairement le ribose, mannitol, lactose, amidon, maltose, fructose, saccharose ne fermentent pas le rhamnose et le sorbitol. Ces isolats appartenant à l'espèce *Lc. Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Sharpe, 1979 ; Schleifer *et al.*, 1985 ; Barlows *et al.*, 1991).

Les isolats C3, C5, C10 fermentent l'arabinose et le mannitol et ne fermentent pas le ribose, le sorbitol et le raffinose, ils sont capables de métaboliser le citrate. Ces souches appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Lopez et Mayo, 1994 ; Badis, 2004 ; Mathara *et al.* , 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Tantaoui-Elaraki *et al.* (1983) ont affirmé la présence de *Lc. diacetylactis* dans le *Lben* marocain. Zadi-Karam et Karam (2005) ont également déclaré la présence de deux souches dans le lait camelin d'Algérie. Ces bactéries connues par leur utilisation comme cultures starters des produits laitiers fermentés. Elles métabolisent le lactose du lait, et leur principal rôle inclus dans le développement de texture par la production des EPS et de flaveur par la production des composés aromatiques (alcools et aldéhydes) et /ou à travers le métabolisme de citrate, acides aminés et les lipides (Kim *et al.*, 2014). *Lc. lactis* subsp. *cremoris* est couramment utilisée comme starter lactique et elle est reconnue comme la meilleure culture pour la fabrication du fromage "*Cheddar*". Parmi les lactocoques, seulement *Lc. Diacetylactis* a le pouvoir de métabolisation du citrate contenu dans le lait. Les métabolites finaux à partir du citrate sont ; le diacétyle, l'acétoïne, le 2,3-butylene glycol, l'acétaldéhyde, l'éthanol et l'acide lactique (Libudzisz & Galewska, 1991), ce qui contribue au développement de flaveur dans les produits laitiers.

Certaines isolats aussi n'hydrolysent pas l'arginine et produisent le citrate, résistent à une concentration de NaCl 4% et une température de 40°C, fermentent le raffinose et ne fermentent pas le sorbitol, peuvent s'apparenter à *Lactococcus raffinolactis* (Badis *et al.*, 2004) (Lopez et Mayo, 1994 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Les trois souches C1, C13, C14 n'hydrolysent pas l'arginine et produisent de l'acétoïne, réduisent le citrate, fermentent le maltose et pas le sorbitol, lactose, amidon,

fructose, l'arabinose, raffinose Ces isolats peuvent s'apparenter à *Lactococcus plantarum* (Lopez et Mayo, 1994 Badis *et al.*, 2004; Mathara *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006).

Guessas et Kihal, (2004), ont identifié les bactéries lactiques du lait de chèvre des zones arides et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles où *Lactococcus* sp a présenté le pourcentage le plus élevé (76.16%), suivi de *Streptococcus* (14.78%) et de *Leuconostoc* (8.6%).

Par ailleurs, on remarque que Badis *et al.*, (2004) ont isolé plus de 75 % de coques lactiques à partir du lait cru de chèvre.

Cette prédominance des coques lactiques par rapport aux bacilles dans le lait cru de chèvre a été déjà mise en évidence dans les travaux de Badis *et al.*, (2005) effectués sur le lait cru de chèvre de deux populations caprines Algériennes (Arabia et Kabyle), qui ont montré que les genres *Leuconostoc* (32.64%) et *Lactococcus* (31.02%) dominent la population Arabia.

A lumière de ces résultats les caractéristiques et les phénotypes qui caractérisent les isolats obtenus semblent similaires à ceux décrit par Badis *et al.*, (2004).

Les espèces de *Lactococcus lactis* et ces sous-espèces sont utilisées à une grande échelle dans l'industrie laitière, elles sont généralement reconnues comme sûres (GRAS) pour la consommation humaine. Elles peuvent être utilisées dans la biopréservation des aliments grâce à son habilité de produire des acides organiques et des bactériocines, nous prenons l'exemple de la nisine autant que la bactériocine la plus connue au domaine de la bioconservation alimentaire, produite par *Lc. lactis*. Les espèces de *Lactococcus* sont aussi utilisées comme cultures probiotiques (Kimoto *et al.*, 1999, 2003; Suzuki *et al.*, 2008).

le système protéolytique composé de plusieurs acteurs comme les protéinases, les peptidases extracellulaires, le system de transport des acides aminés et des peptides et les peptidases intracellulaires, chez les lactocoques, leurs permet de bien hydrolyser les caséines du lait.

Au total de nos souche, la majorité ont une activité protéolytique considérable avec un diamètre de protéolyse qui dépasse les 20mm,notant que les souches *Lc. cremoris* montre un meilleur pouvoir protéolytique.

La lipolyse est un caractère très important, mais les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques par rapport à d'autres groupes de bactéries (Fox *et al.*, 2004 ; De Roissart et Luquet, 1994), mais il a été révélé que certaines souches hydrolysent principalement des triglycerides contiennent des acides gras à longues chins (Katz *et al.*, 2002).

L'activité lipolytique produite est grâce aux systèmes estérase/lipase des bactéries lactiques. Cette activité sert à développer la saveur et l'arôme et même accélère le processus de maturation des fromages ce qui est d'une grande importance technologique.

Remarquable des souches restantes partagent la propriété de ne pas avoir un pouvoir lipolytique appréciable. Ses résultats varient entre lipolyse faible ou dans la plupart des cas, son absence.

Le pouvoir lipolytique pas très répandu chez les bactéries lactiques, est d'une grande importance dans le développement du saveur et la libération des acides gras libres.

Le pouvoir antagonique des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celles qui existent aux environnements laitiers, est un caractère très recherché autant qu'un caractère crucial dans la bio-conservation alimentaire. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme, qui se manifeste par l'apparition des halos d'inhibition (Fleming *et al.*, 1975).

Comme il a été rapporté dans le chapitre précédent, la souche C16 (*Lc. Lactis* subsp. *lactis*) a créé un halo d'inhibition considérable qui a atteint un diamètre de 15 mm vis-à-vis les trois souches indicatrices. Sur ce même ordre d'idée, les auteurs Mechai *et al.* (2014) et Ohta et Boubekri (1995), ont décrit l'effet des souches appartenant au genre *Lactococcus* isolées des produits laitiers fermentés algériens,

De même Joković *et al.* (2014) ont constaté l'effet inhibiteur de *Lc. Lactis* subsp. *cremoris* pour contrôler la flore indésirable dans la production du produit laitier Serbe "*Kajmak*". D'ailleurs, une étude sur l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait fermenté en Burkina Faso par Savadogo A *et al.* (2004), a affirmé l'activité inhibitrice des Lactocoques vis-à-vis *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dont ils ont enregistré des zones d'inhibition (de 8 à 12 mm) moins que les nôtres. Nos résultats montrent qu'ils sont en accord avec plusieurs études mentionnées dans la littérature.

Cette considérable activité peut se revenir au pouvoir acidifiant et l'accroissement de la biomasse des lactocoques, aussi bien la production d'agents inhibiteurs. Nous notons la relation proportionnelle entre la production d'agents antimicrobiens et l'évolution de la biomasse bactérienne comme confirmé dans l'étude réalisée par Ohta et Boubekri (1995) sur la production d'agents antimicrobiens par *Lactococcus* isolées de la *Klila* algérienne envers *L. monocytogenes*. Les lactocoques sont aussi utilisées dans la bioconservation alimentaire grâce à son habilité de produire des acides organiques et même de bactériocines. De même les espèces de *Lactococcus* sont utilisées comme cultures probiotiques.

Notre *Sc. thermophilus* dévoile son capacité d'inhiber la croissance de toutes les souches indicatrices utilisées avec un halo d'inhibition allant de 9 à 14 mm de diamètre, qui rassure l'importance de la souche en industrie laitière. De nombreux

auteurs confirment nos résultats ; Terzić-Vidojević *et al.* (2014) ; Kongo (2013) ; Yang *et al.* (2012) ; Labioui *et al.* (2005).

Il a été démontré que *Sc. thermophilus* peut produire des bactériocines, nommées "thermophilines", alors, son activité a été révélée contre certains microbes de détérioration dans les produits laitiers (Kabuki *et al.*, 2009 ; Fontaine & Hols, 2008 ; Gilbreth & Somkuti, 2005).

L'activité acidifiante des bactéries lactique est l'une des caractères très demandés en industrie laitière, car la production suffisante de l'acide lactique provoque la coagulation du lait, en plus, le pH s'abaisse, ce qui est considéré comme facteur préservant d'aliments. Il est à noter que l'abaissement du pH est inversement proportionnel avec l'augmentation du degré Dornic, comme rapporté par Bourgeois *et al.*, (1996), dont ils décriaient que la production d'acide lactique est suivie par l'abaissement du pH.

CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont parmi les bactéries à Gram-positif les plus étudiées, en particulier à cause de leur importance dans l'industrie agro-alimentaire, elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux, céréales...etc.

Les bactéries lactiques, en raison de leurs transformations principales de source de carbone lui confèrent leurs caractères nutritionnels, thérapeutiques et éventuellement technologiques.

Le but de notre étude est de mettre en place une collection de souches lactococcus extraite de lait cru de chèvre ayant des potentiels technologique pour un usage industriel. Le travail a été réalisé sur 16 isolats, nous nous sommes intéressés spécialement à leurs « activité protéolytique et lipolytique », « activité exopolysaccharide », «activité antibactérienne», « Etude des cinétiques des souches (C4, C10, C16)».

L'évaluation de ces aptitudes a mis en évidence l'existence de bonnes fonctionnalités technologiques chez les isolats testés. Cependant, ces pouvoirs varient selon l'espèce de la souche de lactococcus , même au sein d'une même espèce, qui lui confèrent les propriétés organoleptiques et rhéologiques particulières aux produits laitiers fermentés.

Ceci nous permet de conclure que nos souches testées peuvent être utilisée comme starter dans les fermentations industriels dont le but produire des composés aromatique, EPS, pour une protéolyse et dans la coagulation par leurs aptitudes de diminuer le pH de milieu.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIE



Alais, C. 1984. Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4e éd. 814 pages.

Amrouche L, 2003. Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des Streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. Mémoire. Mag. ENSA, El Harrach, 109 p.

Ayad, E.H.E., Verheul, A., De Jong, C., Wouters, J.T.M., et Smit., G. , 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal* 9: 725–735.

B

Bachmann, H., Starrenburg, M.J., Molenaar, D., Kleerebezem, M., et Van Hylckama V.J.E., 2012. Microbial domestication signature of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* 22: 115-24.

BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. et OUZROUT R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.

Badis., (2006). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Tech.* 23 : 30-37.

Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjemac B, Henni .D.J and Kihal.M , (2004). "Identification and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat Milk of Four Algerian Races," *Food Microbiology*, Vol. 21, No. 5, 2004, pp. 579-588.

Bhosale, S.S., P.A. Kahate, K. Kamble, V.M. Thakare and S.G. Gubbawar (2009). Effect of lactation on physico-chemical properties of local goat milk. *Veterinary World*, Vol. 2 (1) 17-19.

Bibel, D. J. (1988). Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News* , 54: 661-665.

Bigret M, 1989. Probiotics-from Empirism to Science. *Biofutur*, 62-64.

Blom H et Mortvedit C, 1991. Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* 19(3):694-698.

Boumendjel Mahieddine, Nesrine Feknous, Mekidèche Farah, Nabila Dalichaouche, Feknous Ines, Touafchia Lynda, Metalaoui Nadia, Zenki Redouane. (2017). *Caractérisation du lait de chèvre produit dans la région du Nord-Est*

Algérien. Essai de fabrication du fromage frais. Algerian Journal of Natural Products. 5(2): 492-506.

Bruinenberg, P., Vos, P., et de Vos, W., 1992. Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strain : regulation and effect on growth and acidification in milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 58: 78-84.

C

Carr F. J., Chill D., et Maida N. (2002) : The Lactic Acid Bacteria:A Literature Survey.Critical Rev. Microbiol., 28(4):281-370.

Chilliard, Y., 1997. Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre : comparaison avec les laits de vache et humain. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 59: 1-51.

Csapo-Janos, J., J. Csapo-Janosne and A. M.Horvathne (1984). Protein content, protein composition, macro and microelement content of goat milk. *Tejipar*, 33, (3) 61-65.

D

Dalmaso C, Carpentier W, Meyer L, Rouzioux C, Goujard C, Chaix M-L, et al. (2008) Distinct Genetic Loci Control Plasma HIV-RNA and Cellular HIV-DNA Levels in HIV-1 Infection: The ANRS Genome Wide Association 01 Study. *PLoS ONE* 3(12): e3907.

Daniel Babo (2000). Races ovines et caprines françaises. Editions France Agricole:1ere édition ; p ??.

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.

DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.

DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.

Desmazeaud M.J., De Roissart H. (1994). Métabolisme général des bacteries lactiques in « Bacterie lactique ». De Roissard et Luquet, Tech.Doc.,Lavoisier, Paris.

Dhartiben B. Kapadiya¹, Darshna B. Prajapati¹, Amit Kumar Jain¹, Bhavbhuti M. Mehta¹, Vijaykumar B. Darji² and Kishorkumar D. Aparnathi¹.(2016). Comparison of Surti goat milk with cow and buffalo milk for gross composition, nitrogen distribution, and selected minerals content. *Veterinary World*, Vol9: 2231-0916.

DORTU C. et THONART P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 13(1) : 143-154.

E

El-Alamy H.A., M. A. El-Ashry and A. M. Kolif (1987). Effect of different concentrate and roughage ratios in rations on the yield, composition and properties of goats milk. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 15. 151- 159.

EL-BARADEI, G., DELACROIX-BUCHET, A. et OGIER, J.C.,(2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* 121: p295–301.

EL-GHAISH S., AHMADOVA A., HADJI-SFAXI I., EL MECHERFI K.E., BAZUKYANE I., CHOISSET Y., RABESONA H., SITOHY M., POPOV Y.G., A. KULIEV A., MOZZI F., CHOBERT J.M. et HAERTLÉ T., 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre. Food Sci. Technol.* 1-8.

F

FAO, T. W. H. O. (2001) .Probiotic definition de **ROISSART H.B. (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Eds. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.

Farrow, A., Jacobs, A. & West, R.R. (1989) Myelodysplasia, chemical exposure and other environmental factors. *Leukemia*, 3, 33–35.

Fernandez, E., Alegría, A., Delgado, S., Cruz Martín, M., et Mayo B., 2011. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp *cremoris*. genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 77: 5324–5335.

G

GALVEZ A., ABRIOUEL H., BEN OMAR N. and LUCAS R., 2011. Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp, 253-390.

Gollop N., Zakin V et Weinberg Z.G,2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 98,662-666.

Guessas B., Adjoudj F, Hadadji M & Kihal M, (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Appl. Sci. J.* 17(4): 480 -488.

Guiraud J.P. et Galzy P., (1980)., L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. 1-239.

Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. 1e Ed., Dunod. Paris. 136-144.

H

Hadef S., (2012)., Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister soutenu le 18-04-2012. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Algérie.

Hadef, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse magister . Université Ouargla, 135p.

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre, p. 37-55.

Hassaïne, O. (2013). Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran, 180p.

HASSAN A.N. and 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.

Hayam M. Abbas, Fatma A.M. Hassan, Mona A.M. Abd El-Gawad and A. K. Enab. (2014). Physicochemical Characteristics of Goat's Milk. *Life Science Journal.* 11(1s) :307-317].

Hejtmankova A.; V. Pivec; E. Trnkova, H. Dragounova (2012). Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period *Czech J. Anim. Sci.*, 57,(7) 323-331.

Helinck, S., Richard, M., et Juillard, V., 1997. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* depend on the type of the enzyme. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 63: 2124-2130.

Helmut K.M. and G. Fiechter (2012). Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria-Seasonal Variations and differences between six breeds. *Dairy Sci & Technol.* 92, 167-177.

Hemme,D., et Foucaud-Scheunemann, C.2004. Leuconostoc, caractéristique, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Internatonal Dairy Journal* ;14:467-494.

Hennane M.,2011.Lait cru de chèvre en algérie.Université Abderrahmane Mira de Béjaia, Algérie.

Hoefnagel,M.H.N.,Starrenbourg, M.J.C., Martens, D.E., Hugenholtz,J., Kleerebezem, M., VanSwam, I.I., Bongers, R.,Westerhoff, H.V., et Snoep, J.L., 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modeling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology*, 148:1003-1013.

HOGG T., 2005. Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

I

Ibourahema COULIBALY (2010). Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques (thèse de doctorat en français) ; Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, (Belgique), 260 p.

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., (2009). Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk:Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 60(2) : 177-183.

J

Jaubert,G.,1997. Biochemical characteristics and quality of goat milk. *CHEAM. Option Méditerranéennes.* 25: 71-74.

Jean Paul Iarpent, 1997. Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire,(3eme édition),p706.

K

Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1209–1234. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kempler GM, McKay LL (1980) Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl Environ Microbiol* 39:926–927.

Kempler,G.M.,et McKay,L.L., 1979. Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 37: 316–323.

Khuntia A et Chaudhary L.C, 2002. Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian journal of Animal Sciences* 15,188-194.

Kihal Mebrouk ;,(2005).Caracterisation phenotypique des bacteries lactique isolees à partir de lait cru de chèvre de deux population carrines locales"Arabia et Kabyle".*Sciences et technologies .* 23:30-37.

L

Lehninger A. L.(1981). Biochimie bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème Ed, Flammarion médecine-science.

LEVEAU J.Y. et BOUIX M., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 85-87.

M

MAGHNIA DJAMILA.,(2011).étude de potentiel technologiques des bactéries lactiques isolée des aliments ferments traditionnelles algeriens.

Makhloufi .K. M. (2012) Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv).

MATAMOROS S., 2008. Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. *Thèse de Doctorat en Microbiologie.* Université de Nantes.189p.

MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E., AND ELLIKER, P.R., (1962): A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656.

Metchnikoff E., (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W.,Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

Michel Lamontagne, Claud P. Champagne, Joelle Reitz- Aousseur, Sylvain Moineau, Nancy Gardner, Maryse Lamoureux, Julie Jean et Ismail Fliss (2002). Microbiologie de lait. Science et technologie de lait. Ecole polytechnique de Montréal.

MKRTCHYAN H., GIBBONS S., HEIDELBERGER S., ZLOH M. and LIMAKI H.K., 2010. Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an

antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain marine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, 35: 255-260.

Morgan,F., Bodin,J.P.,et Gaborit,P., 2001. Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait* 81: 743-756.

Morsy, T.A. S.M. Kholif, O.H. Matlouy, M.M. Abdo and M.H. El-Shafie (2012). Impact of Anise, Clove and Juniper Oils as feed additives on the productive performance of lactating Goats. *International Journal of Dairy Science*. 7(1) 20-28.

N

Noelia Fernanda PAZ1, Enzo Goncalvez de OLIVEIRA1,Martha Susana Nunez de KAIRUZ2, Adriana Noemi RAMON1(2014). Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt, *Food Science and Technology*. 34(3): 629-635.

Nomura, M., Kobayashi, M., Narita,T., Kimoto-Nira, H., et Okamoto, T., 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 101: 396-405.

P

Park,Y.W., 2006. Goat milk-chemistry and nutrition, in Park et Haenlein (eds) *Handbook of milk of non-bovine mammals*, pp: 34-58, Blackwell Publishing Professional, USA.

Park,Y.W., Zhang, H., Zhang, B., et Zhang, L., 2006. Mare milk, in Park et Haenlein (eds),*Handbook of milk of non-bovine mammals*, pp. 275-296. Blackwell Publishing Professional,USA.

Penaud, S. (2006). Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842 . thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 267p.

Penner et al (2005). Probiotics and nutraceuticals: no medicinal treatments of gastrointestinal diseases. In *Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

Perez,T., Balcazar,J.L.,Peix,A.,Valverde, A.,Velazquez, E., de Blas, I., et Ruiz-Zarzuélan,I., 2011. *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. *nov.* isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1894–1898.

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

R

Rademaker, J.L.W., Herbet, H., Starrenburg ,M.J.C., Naser, S.M., Gevers, D., Kelly, W.J., Hugenholtz, J., Swings, J., et van Hylckama Vlieg, J.E.T ., 2007. Diversity analysis of dairy and non dairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG) 5-PCR fingerprinting. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 73: 7128–7137.

Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M. et Loubière P., (2003). Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023.

Raynaud,S., 2006. Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Doctorat spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Filière Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Université Paul Sabatier.Toulouse, France.

Raynaud. S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d.ordre : 826 pages : 309.

Ried et al (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

Ross.P. R ; Morgan, S. et Hill, C. (2002). Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* 79: 3 – 16.

S

Salawu M.B., Warren E.H et Adesogan A.T,2001. Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiler pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Jornal of the science of Food and Agriculture* 81,1263-1268.

Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L et Benno Y, 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven today in lactic Acid bacteria: Microbiologica and functional Aspects.Eds salimen, S., von Wright, A. and Ouwerhand A., New york Dekker M. pp 515-530.

SALMINEN S., WRIGHT A.V. and OUWEHAND A., 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc., U.S.A.*

SAMELIS J., MAUROGENAKIS F. and METAXOPOULOS J., 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23, pp. 179-196.

Scardovi, V. (1986) Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924,472^{al}. In: Sneath, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (eds Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.). Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 1418–1434.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D. & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 6, 183–195.

Siezen, R.J., Starrenbourg, M.J.C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D et Van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2007. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* plant isolates identifies adaptation mechanisms to the plant niche. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 74: 424-436.

Stackebrandt E., Teuber M.(1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *National Institutes of Health* . 70(3):317-24.

STACKEBRANDT, E., LUDWIG, W., SEEWALDT, E. & SCHLEIFER, K. H. (1983). Phylogeny of sporeforming members of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic Bacteriology* (in the Press).

STILES M.E. and HOLZAPFEL W.H., 1997. Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

Stiles M.E. et Holzapfel W.H.,(1997)., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.*Streptococcus Thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) non.Rev.sist Appl.Microbiol.14:386-388.

T

Tachon, S., Bernhard Brandsma, J., et Yvon, M., 2009. NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 76: 1311.

TAMIME A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

Tanous, C., Chambellon, E., Le Bars, D., Delespaul, G., et Yvon, M., 2006. Glutamate deshydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 72: 1402-1409.

Teuber, M., et Geis, A., 2006. The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. Prokaryotes. 4: 205-228.

Teuber, M., Geis, A., et Neve, H., 1995. The genus *Lactococcus*. In Balows A, Truber HG, Dworkin, Harder MW et Schleifer KH(eds). The Prokaryotes . Vol II. 2nd. 1482 1501 Springer- Verlag, New York, USA.

Thomas T (1973), Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. NZ J Dairy Sci Tech 8:70–71.

U

UEHARA S., MONDEN K., NOMOTO K., SENO Y., KARIYAMA R. and KUMON H.,2006. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.

W

Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y et Gamburg M, 2004. Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118,1-9.

Y

Yateem, M.T. Balba, T. Al-Surrayai, B. Al-Mutairi and Al-Daher,R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*. 3 (4): 194- 199.

Z

ZHANG H. and CAI Y., 2014. Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. *Springer Dordrecht Heidelberg*. New York London. 536p.

ANNEXES

Annexe 1:**Technique de Coloration de Gram :**

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
 - Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
 - Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ;
 - Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée ;
 - Couvrir de lugol pendant 30 secondes ;
 - Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
 - Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette;
 - Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
 - Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
 - Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
 - Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.
- Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres

Annexe 2:**Milieux de culture :**

-Milieu Elliker lactosé (Elliker, 1956).

Composant.....	g/l
Tryptone.....	20g
Extrait de levure.....	5g
Gélatine.....	2,5g
NaCl.....	4g
Acétate de Sodium.....	1,5g
Glucose.....	5g
Lactose.....	10g
Acide ascorbique.....	0,5g

pH= 7. Autoclavage 120°C pendant 20 min

-Clark et Lubs

Composant	g/l
Peptone.....	5g
Phosphate dipotassique.....	5g
Glucose.....	5g
Eau distillée.....	950ml

Ph=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

-Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Composant	g/l
Tryptone.....	20g
Gélatine.....	2.5g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g
Citrate de sodium.....	1g
Azide de sodium.....	0.075g
Agar-Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000g

pH =6,8 ; Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Composant	g/l
Infusion de viande de bœuf.....	3000
	cm3
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar-agar.....	17 g

pH=7.4 ; Autoclavage 120°C/ 20 minutes

-milieu KMK (Kempler Mc Kay, 1980)

Composant	g/l
Biopolytone.....	3g
Glucose.....	2,5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	950ml

Ph=6,6. Autoclavage 120°C pendant 15min

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

-lait de Sherman

Composant	g/l
Lait écrémé.....	10g
Extrait de levure.....	0,5g
Eau distillée.....	950ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0.1%de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1%déjà stérilisé à 120°C pendant 20mn. Et pour avoir u lait à de bleu de méthylène , on ajoute au moment de l'emploi 1 ml de bleu de méthylène à 3%.

-milieu BEA

Composant	g/l
Peptone.....	17g
Peptone pepsique de viande.....	3g
Extrait de levure.....	5g
Esculine.....	1g
Citrate de fer ammoniacal.....	1g
Bile de boeuf déshydratée.....	0,5g
Azide de sodium.....	10g
Chlorure de sodium.....	0,25g
Agar-agar.....	13g
Eau distillée.....	950ml

-milieu PCA (*Plate count agar*)

Composant	g/l
Tryptone	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Agar	15g

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20 min.

-lait écrémé

Composant	g/l
Lait écrémé en poudre.....	10g
Extrait de levure.....	0,5g
Eau distillée.....	950ml

Autoclavage 110°C pendant 10min

-Eau physiologie :

Composant	g/l
Chlorure de sodium.....	8,5g
Peptone.....	0,5g
Eau distillée.....	950ml

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min