

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BELAHMAR Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: Production et transformation laitière

THÈME

Cinétique d'acidification et activité
protéolytique d'un *Lactobacillus brevis*
et application fromagère

Devant les membres du jury

Président	Dr TAHLAITI Hafida Université de Mostaganem
Examineur	Dr MEJAHED Mostefa Université de Mostaganem
Encadreur	Dr DAHOU Abdelkader El Amine Université de Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Au nom du Grand Dieu; le clément; le miséricordieux

Louanges au prophète Mohamed

✓ *Mes premiers remerciements vont à mon enseignant Monsieur « DAHOU Abdelkader El Amine», de la spécialité Production et Transformation Laitière, du département des Sciences Alimentaires, de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem ; d'avoir accepté de diriger et d'orienter ce travail de master ; je le remercie aussi pour ses orientations , son accompagnement tout au long de ma formation, son accueil à la réalisation de ce projet de fin d'études, son aide et ses conseils très précieux dans l'exploitation des résultats.*

Il est agréable d'exprimer ma pleine gratitude pour votre simplicité et votre générosité preuve de votre qualité humaine et scientifique.

✓ *Je tiens à exprimer mes remerciements au Dr TAHLAITI Hafida de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem qui a accepté d'évaluer ce travail et de présider ce jury, qu'elle soit ici remercier de l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.*

✓ *Nous tenons à remercier Dr MEDJAHED Mostefa d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner mon travail.*

✓ *Mes remerciements s'adressent au chef du département des Sciences Alimentaires, à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation, à notre épanouissement dans ce parcours et pour leurs aides et encouragements au cours de nos études.*

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et qui m'ont éclairé le chemin par leur soutien, assistance et conseils judicieux. J'espère qu'un jour, je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête bonheur et longue vie et la bonne santé.

Tous les membres de ma famille

Tous mes camarades du parcours de formation

Au nom de l'amitié qui nous unit et les souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de bonheur.

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Résumé

En technologie fromagère la coagulation du lait est une étape essentielle dans laquelle l'utilisation d'un ferment peut être des souches sélectionnée ou un mélange de souche qui n'a pas toutes les mêmes performances et propriété technologie ce qui conduit à une grande variation dans la qualité du fromage.

Le présent travail vise la mise en évidence des aptitudes technologiques d'une souche de bactérie lactique autochtone de nos produits laitiers du terroir « *Lactobacillus brevis* ». La souche a été revivifiée et contrôlée par une re-caractérisation phénotypique par la détermination des caractéristiques morphologiques physiologiques. L'étude a porté sur le suivi du pouvoir acidifiant, de la production d'acide lactique, de la coagulation lactique avec ses temps technologiques, de la détermination du rendement fromager en % et du rendement fromager en extrait sec total. La souche de *Lactobacillus brevis* a été performante avec un bon pouvoir acidifiant (Evolution de l'acidité de 21°D à 102°D) et une aptitude fromagèble avec un excellent profil protéolytique (Activité protéolytique à 1, 2 et 3%). Par ses performances, cette souche révèle de bonnes aptitudes technologiques sur le plan application fromagère et sur des critères de fromagèabilité, de coagulation lactique, de rendement fromager et de rendement en extrait sec total. Cette caractérisation technologique nous amène à conclure que cette souche pourra être utilisée en application fromagère soit en culture seule, ou mixte et avec une opportunité d'utilisation dans une technologie de fabrication fromagère de type lactique ou de type mixte enzymatique à dominance lactique.

Mots clés : Aptitudes technologiques, *Lactobacillus brevis*, Coagulation lactique, Fromageabilité.

Abstract

Abstract

In cheese technology, milk coagulation is an essential step in which the use of a fermenter can be selected strains or a mixture of strains which do not all have the same performance and technology property, which leads to a great variation in the quality of the cheese.

The present work aims to highlight the technological abilities of a strain of lactic acid bacteria indigenous to our local dairy products "*Lactobacillus brevis*". The strain was revived and controlled by a phenotypic re-characterization through the determination of physiological morphological characteristics. The study focused on the monitoring of acidifying power, lactic acid production, lactic coagulation with its technological times, determination of cheese yield in % and cheese yield in total dry extract. The *Lactobacillus brevis* strain performed well with a good acidifying power (acidity evolution from 21°D to 102°D) and a cheesability with an excellent proteolytic profile (proteolytic activity at 1, 2 and 3%). By its performances, this strain reveals good technological aptitudes on the cheese application level and on the criteria of cheesability, lactic coagulation, cheese yield and yield in total dry extract. This technological characterization leads us to conclude that this strain could be used in cheese application either in single or mixed culture and with an opportunity of use in a cheese making technology of lactic type or mixed enzymatic type with lactic dominance.

Key words: Technological aptitude, *Lactobacillus brevis*, Lactic coagulation, Cheesability.

الملخص

في صناعة الجبن، يعد تخثر الحليب خطوة أساسية حيث تعتمد من خلاله استعمال سلالات أو مزيج من السلالات مختلفة الخصائص تتحكم في تنوع و جودة الجبن .

يهدف هذا البحث إلى تسليط الضوء على القدرات التكنولوجية لسلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك الأصلية لمنتجات الألبان المحلية. "*Lactobacillus brevis*" تم إحياء السلالة والتحكم فيها من خلال إعادة توصيف النمط الظاهري من خلال تحديد الخصائص المورفولوجية والفسولوجية. ركزت الدراسة على رصد قوة الحموضة ، إنتاج حامض اللاكتيك ، تخثر اللاكتيك مع أوقاته التكنولوجية ، تحديد محصول الجبن في النسبة المئوية وحاصل الجبن في المستخلص الجاف الكلي. كان أداء سلالة *Lactobacillus brevis* جيدًا مع قوة حمضية جيدة (تطور الحموضة من 21 درجة D إلى 102 D) وقابلية تحويل الحليب الى جبن مع تحليل بروتيني ممتاز (نشاط تحلل البروتين عند 1 و 2 و 3%). من خلال أدائها ، تكشف هذه السلالة عن قدرات تكنولوجية جيدة على مستوى تطبيق تحويل الحليب الى اجبان وعلى معايير قابلية التخثر اللبني وإنتاجية الجبن والمحصول في المستخلص الجاف الكلي. يقودنا هذا التوصيف التكنولوجي إلى استنتاج أنه يمكن استخدام هذه السلالة في تطبيق الجبن او في تخثر لبني فردي أو مختلط .

الكلمات المفتاحية: الكفاءة التكنولوجية ، *Lactobacillus brevis* ، تخثر اللاكتيك ، قابلية تحضير الجبن.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

Introduction

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les bactéries lactiques04.

Chapitre II : Rôle des bactéries lactique.....18

PARTIE PRATIQUE

Chapitre III : Matériel et Méthodes28..

Chapitre IV : Résultat et discussions38

CONCLUSION.....49.

Annexes

Reference Bibliographiques

Table des matières

Liste des abreviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction

Partie 1 Synthèse bibliographique

***Chapitre I* Les bactéries lactiques**

I.	Définition du lait :	3
II.	Les Bactéries lactiques :	3
II.1.	Présentation des bactéries lactiques :	3
II.2.	.Habitat et origine des bactéries lactiques :	5
II.3.	Taxonomie des bactéries lactiques :	7
II.4.	Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques: :	10
II.4.1.	Lactobacillus	10
II.5.	Les exigences des bactéries lactiques en nutriments	17

***Chapitre II* Rôle des bactéries lactiques**

III.	Rôle des bactéries lactiques:	18
III.1.	Rôle technologique	18
III.2.	Rôle métabolique	19
I.1.	Fermentation lactique	20
III.3.	Les systèmes autolytique et protéolytique	22
III.4.	Le système autolytique	23
III.5.	Coagulation lactique	24

Partie 2 Etude expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes	28
I. Objectif de l'étude	29
II. Matériel et produits du laboratoire :	29
III. Méthodes :	30
III.1. Culture et identification du <i>Lactobacillus brevis</i>	30
IV. Ensemencement	31
V. Repiquage et purification.....	31
V.1. Revivification de la souche lactique :	31
V.2. Purification de la souche	31
VI. Conservation des souches lactiques :	32
VI.1. Méthode de conservation :	32
✓ Conservation à court terme:.....	32
VII. Identification.....	33
VII.1. Tests biochimiques :	33
VII.2. Observation macroscopique et microscopique :	34
VIII. Etude des aptitudes technologiques de la souche lactique « <i>Lactobacillus brevis</i> » ..	35
VIII.1. Etude de la cinétique de croissance du <i>Lactobacillus brevis</i> :	35
VIII.2. Pouvoir acidifiant :	36
VIII.3. Production d'acétoïne :	37
VIII.4. Pouvoir protéolytique:.....	37
VIII.5. Recherche du type fermentaire de la bactérie lactique étudiée :	37
VIII.6. Essai de fabrication d'un caillé fromager.....	37
 Chapitre IV Résultats et discussions	 27
1. Revivification et purification de la souche lactique.....	35
✓ Examen macroscopique	35
✓ Examen microscopique.....	35
✓ Test de la catalase	36
2. Etude la cinétique de croissance en milieu lait.....	36
3. Etude des aptitudes technologiques de la souche lactique « <i>Lactobacillus brevis</i> »	37
✓ Etude la croissance d'acidification	37

✓ Production d'acétoïne	40
✓ Pouvoir protéolytique	41
✓ Recherche du type fermentaire de la bactérie lactique étudiée :	43
4. Essai de fabrication d'un caillé fromager :	44
✓ Coagulation du lait.....	45
✓ Coagulation acide	45
✓ Caractéristiques de la coagulation	45
✓ La préparation du coagulum « caillé lactique ».....	46
a) Rendement fromager	46
✓ Calcul du rendement fromager	46
b) Détermination de l'extrait sec total (EST).....	47
c) Détermination d'humidité.....	48
Conclusion.....	61

References bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations, des acronymes et des sigles

PH : Pententiel hydrogène

D°: Degré dornic

En: Enterococcus

EPS: Exopolysaccharides

EST: Extrait sec total du lait

H₂O₂: Hydroxyde d'hydrogène

L c: Lactococcus

St: Streptococcus

Lb: Lactobacille

MRS: Man Rogosa Sharp

Na Cl: Chlorure de sodium

Na OH: Hydroxyde de sodium

St : Streptococcus

TP : taux protéique

µm: Micromètre

Liste des figures

Figure 2 : (a) 1a. <i>Lactobacillus rosell-11</i> observé au microscope électronique à transmission.....	4
Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de Firmicutes (Lahtinem et al, 2012)	8
Figure 4: Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques d'ordre Lactobacillales basé sur la comparaison des séquences du gène de 16S d'ARNr (Bergey's manual of systematic bacteriology ,2009).....	9
Figure 5: Morphologie de <i>Lactococcus lactis</i> observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000) (Teubeur et Geis ,2006).....	12
Figure 6 Fixation des <i>Leuconostocs</i> sur les moules en grès-vernisé	13
Figure 7: Morphologie de <i>Pediococcus pentosaceus</i> en microscopie électronique à transmission (wallace <i>et al</i> ,2003).....	14
Figure 8: Morphologie de <i>Streptococcus thermophilus</i> observé au microscope électronique a transmission (M.E.T.) (x 10000) (Liebefeld, 2002).....	15
Figure 9 : Morphologie d' <i>Enterococcus faecalis</i> observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000). (https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus faecalis)	16
Figure 10: Morphologie de <i>Bifidobacterium longum</i> observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000) (https://fr.wikipedia.org/wiki/Bifidobacterium longum).....	17
Figure 11:Le métabolisme de citrate chez les bactéries lactiques (Cogan, 1981).....	20
Figure 12: voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier,2007).	21
Figure 13: voie Voie métabolique de la fermentation lactique hétérofermentaire (Tessier,2007).	22
Figure 14: Représentation schématique du système protéolytique chez <i>Lactococcus lactis</i> B) ...	23
Figure 15: les mécanismes de ces deux types de coagulation de Le lait et sa coagulation , (Florian Ronez.....	26
Figure 16: Ensemencement de la souche <i>Lactobacillus brevis</i> dans différents milieux	31
Figure 17: le test catalase de souche <i>lactobacillus brevis</i>	34

Figure 18: protocole pour la mesure de l'acidité Dornic « Acidimètre ».	35
Figure 19: le protocole à suivre pour la réalisation du test d'acidité	36
Figure 20: Observation microscopique après coloration de Gram du <i>Lactobacillus brevis</i> .	35
Figure 21: Cinétique de croissance et numération bactérienne du <i>Lactobacillus brevis</i>	36
Figure 22: Mesure de la cinétique d'acidification de <i>Lactobacillus brevis</i> en ° Dornic	38
Figure 23: Variation de pH de <i>Lactobacillus brevis</i> pendant 24 heures.	38
Figure 24: Coagulation lactique avec <i>Lactobacillus brevis</i> repurifié	39
Figure 25: Production d'acétoïne	40
Figure 26: Activité protéolytique du <i>Lactobacillus brevis</i> à 1%	41
Figure 27: Activité protéolytique du <i>Lactobacillus brevis</i> à 2%.	42
Figure 28: Activité protéolytique du <i>Lactobacillus brevis</i> à 3%.	42
Figure 29: Profil fermentaire après 7 jr d'incubation a 37 °C	44

Liste des tableaux

Tableau 1: Milieux d'isolement des bactéries lactiques	6
Tableau 2: Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (Sharpe, 1981 ; Kandler et Weiss 1986).....	11
Tableau 3: Principales caractéristiques des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 2004)	17
Tableau 4: Verrerie et appareillage utilisé dans notre étude expérimentale.....	29
Tableau 5: les produits et milieux de cultures utilisés	30
Tableau 6: Milieux spécifiques utilisés et conditions d'incubation pour le contrôle de la pureté de la souche.	30
Tableau 7: Critères d'observation morphologiques de la souche lactique utilisée.	34

Introduction

Introduction

Le lait est une suspension liquide complexe secrété par les glandes mammaire des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, d'une saveur douceâtre et d'un ph (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité.

La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques jouent un rôle important dans les fermentations lactique, c'est-à-dire une réaction de transformation du lactose en acide lactique.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. La caractérisation des bactéries lactiques a favorisé le développement de souches bactériennes définies, connues sous le nom de levains ou de cultures starters. Elles remplacent de plus en plus depuis quelques décennies les mélanges non définis traditionnellement employés en industrie laitière (**Soomro et al 2002**).

Les ferments lactiques jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitière et la recherche de nouvelles souches possédant des activités biologiques particulières est en pleine expansion dans le secteur de l'industrie laitière (**Zadi Karam et al ., 2004; Hassaine et al., 2008; Roudj et al., 2009; Belkheir et al., 2016; Boublenza et al., 2018**).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les laits fermentés, les fromages, les olives fermentées, les divers produits fermentés par les ferments lactiques commerciaux (**Axelsson, 2004**).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques. Ces bactéries inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs tels que les bactériocines et en abaissant le pH par la production d'un produit majeur, l'acide lactique (**Ameen et Caruso, 2017 ; Dahou et al., 2015**).

Cette étude a pour objectif de faire la revivification et la ré-caractérisation phénotypique d'une bactérie lactique autochtone des produits laitiers du terroir (*Lactobacillus brevis*), d'étudier ses aptitudes technologiques (aptitude à la coagulation, rendement fromager, rendement en extrait sec total) en utilisant des laits préparées au niveau du Laboratoire des Sciences et

Introduction

Techniques de Production Animales (LSTPA), de Hassi Mamèche, affilié à l'Université de Mostaganem..

Le travail élaboré selon le plan suivant et qui comprend :

- Une première partie relative une étude bibliographique qui met l'accent sur la présentation des bactéries lactiques et les caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques, et leurs rôles
- Une deuxième partie reporte la description du protocole expérimental en plusieurs étapes en exposant les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail : revivification des souches lactiques et l'étude de quelques aptitudes technologiques (la cinétique d'acidification, pouvoir acidifiant, coagulation lactique avec la caractérisation de ses temps technologiques, rendement fromager en % et rendement fromager en extrait sec total (g)).

L'expérimentation est suivie d'une interprétation et discussion des résultats obtenus dans cette étude.

-Une troisième partie est réservée à la conclusion avec des perspectives à cette étude réalisée.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les bactéries lactiques

I. Définition du lait :

Le lait, destiné à l'alimentation humaine, a été défini selon le congrès de Genève en 1909 comme : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum ».

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, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité (**Pougheon et Goursaud, 2001**).

Le lait, proche du plasma sanguin, est un sérum comportant une émulsion de matière grasse, une suspension de matière protéique caséuse, du lactose, des sels et minéraux, des protéines solubles et des traces d'éléments divers à l'état de traces mais au rôle biologique important. Quatre composants sont dominants (**Vignola, 2002**) du point de vue quantitatif dans le lait de vache :

- l'eau (90%)
- les matières grasses (3%)
- les protéines solubles et insolubles (3%)
- le lactose (4%)

II. Les Bactéries lactiques :**II.1. Présentation des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisés en industrie alimentaire, dans une grande variété de fermentations. En effet, ces bactéries participent à la transformation de produits animaux tels le lait et certains produits carnés ainsi qu'à l'élaboration de produits végétaux. Elles sont aussi connues pour leur rôle probiotique (**Braegger, 2002**).

Ce groupe bactérien regroupe un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides. La fermentation est dite homofermentaire si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé, et hétérofermentaire si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂, etc...) (**Larpent, 1996**).

Ce sont des microorganismes hétérotrophes et chimio-organotrophes, non sporulés, habituellement aéro-anaérobies et catalase négatives. Acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 5,5 ces bactéries sont généralement immobiles. Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (coques/genre *Streptococcus*, *Lactococcus*,...), en bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc* ssp.) (Corrieu et Luquet, 2008; Galvez *et al.*, 2011).

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes (Salminen *et al.*, 2004; Fröhlich et König, 2009; Pringsulaka *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles sont très fréquentes dans la nature, ubiquistes, et on les trouve donc dans différentes niches écologiques. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées des produits laitiers, de la viande, des fruits en décomposition, du poisson fermenté, des eaux usées et des cavités (buccale, les organes génitaux, les voies intestinales et respiratoires) des humains et des animaux (König et Fröhlich, 2009).

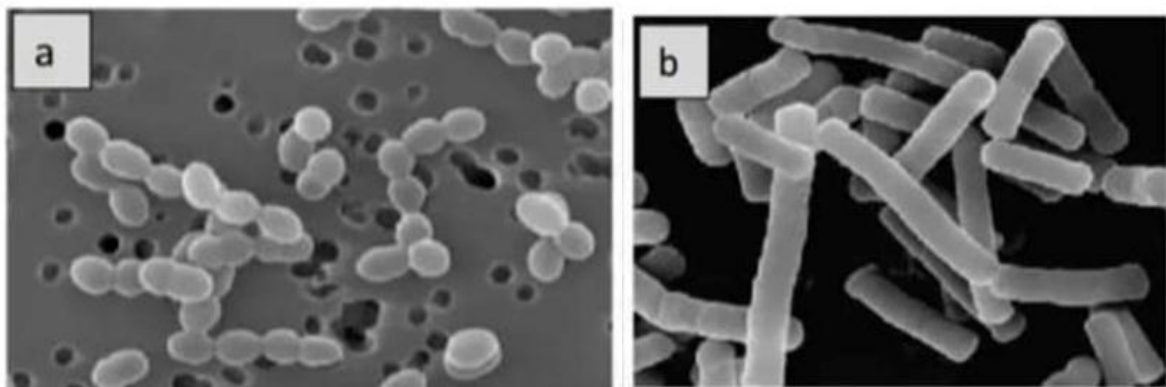


Figure 1 : (a) 1a. *Lactobacillus rosell-11* observé au microscope électronique à transmission

(M.E.T.) (x 10000) ,

(b) 1b. *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x10000) (Makhloufi, 2011).

II.2..Habitat et origine des bactéries lactiques :

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 naturel, il contient plus de 100 espèces se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies (**Coulibaly, 2010**).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé). (**Bergey's manual., 2009**) Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux. Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja). (**Bekhouche., 2006**).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (**Demazeaud., 1996**).

Tableau 1: Milieux d'isolement des bactéries lactiques

Bactéries lactiques	Habitat ou milieu d'isolement.
Lactobacillus	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Végétaux
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yaourt, fromage
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Lait, fromage
<i>Lb. acidophilus</i>	Bouche, tractus intestinal
<i>Lb. gasserii</i>	Bouche, tractus intestinal
<i>Lb. helveticus</i>	Fromage
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Rumen
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	Fromage, fourrage
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	Bouche
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Tractus intestinal
<i>Lb. sake</i>	Végétaux, produits carnés
<i>Lb. curvatus</i>	Végétaux, produits carnés, lait
<i>Lb. bavaricus</i>	Végétaux
<i>Lb. plantarum</i>	Végétaux, fromage, produits carnés, bouche
<i>Lb. bif fermentans</i>	Fromage
<i>Lb. brevis</i>	Végétaux, lait, fromage, tractus intestinal
<i>Lb. buchneri</i>	Végétaux, lait, fromage, bouche
<i>Lb. kefir</i>	Kéfir
<i>Lb. reuteri</i>	Tractus intestinal, produits carnés
<i>Lb. fermentum</i>	Végétaux, fromage, bouche
<i>Lb. confusus</i>	Végétaux
<i>Lb. viridescens</i>	Produits carnés
<i>Lb. sanfrancisco</i>	Pain
Lactococcus	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lait cru, laits fermentés, végétaux
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Végétaux, lait
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lait
<i>Lc. raffinolactis</i>	Lait caillé
<i>Lc. garviae</i>	Lait de mammité
Leuconostoc	
<i>Ln. oenos</i>	Lait, produits laitiers, fruits, légumes, végétaux en fermentation (choucroute), produits de panification, Solutions visqueuses de sucres Vin (absent dans le lait)
Pediococcus	
<i>Pc. pentosaceus</i> , <i>Pc. acidilactici</i>	Végétaux, boissons (bière, cidre et vin)
<i>Pc. halophilus</i>	Matières végétales, lait et produits laitiers Produits de pêche, anchois salé
Streptococcus thermophilus	Lait, produits laitiers, yaourt, levains artisanaux

II.3. Taxonomie des bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Lahtinem et al, 2012).

Suivant (Felis et al., 2015) ; du point de vu taxonomique, les bactéries lactiques sont un vaste ensemble de microorganismes procaryotes qui se rattache au phylum des Clostridium. Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales (Garrity et al., 2007).

Les critères utilisés (morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres) sont toujours très importants pour la classification des BL, bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont considérablement augmenté le nombre de genres de BL a partir des quatre initialement reconnue par Orla-Jensen (Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus et Streptococcus) (Lahtinem et al, 2012).

Une importante étape a été franchie en 1977 par Woese et Fox qui ont introduit la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode a révolutionné la taxonomie des bactéries et la classification des BL a été profondément modifiée.

L'ancien genre Streptococcus était divisé au début en trois groupes: Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus sensu stricto, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux Lactococcus, ont formé un autre genre séparé; c'est les Vagococcus. Les genres Lactobacillus, Leuconostoc et Pediococcus sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques.

Les Leuconostoc oenos, les « Leuconostoc du vin», ont formé le genre Oenococcus (Axelsson, 2004).

Le genre Bifidobacterium est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques (du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments) mais il est phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières (Gonzalez et al., 2008; Gevers 2002 ; Patrignani et al. 2006).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement du point de vu morphologique en bacilles (Lactobacillus et Carnobacterium) et coques (tous les autres genres). Le genre Weissella est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al, 1993; Ho et al. 2007) . 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 Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.... (Pot, 2008) répartis sur six familles (Fig.1). Parmi ces genres, seulement douze sont importants d'un point de vue biotechnologique (tab.1) (Fig.2) (Axelsson, 2004; Guiraud et al, 2003).

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes

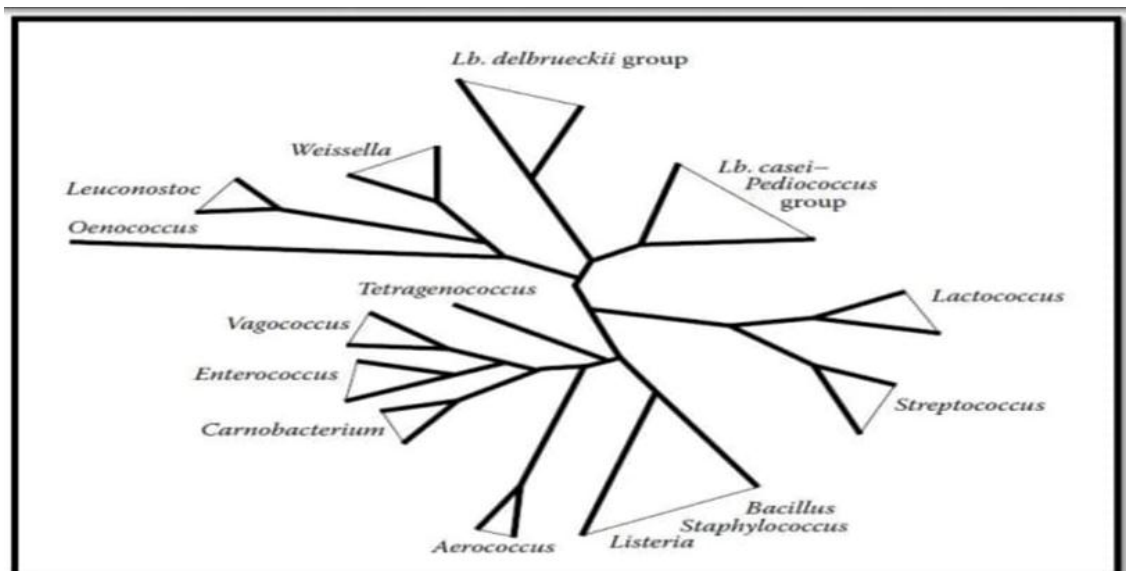


Figure 2 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, incluant quelques genres aérobie et anaérobie facultatif de Firmicutes (Lahtinem et al, 2012)

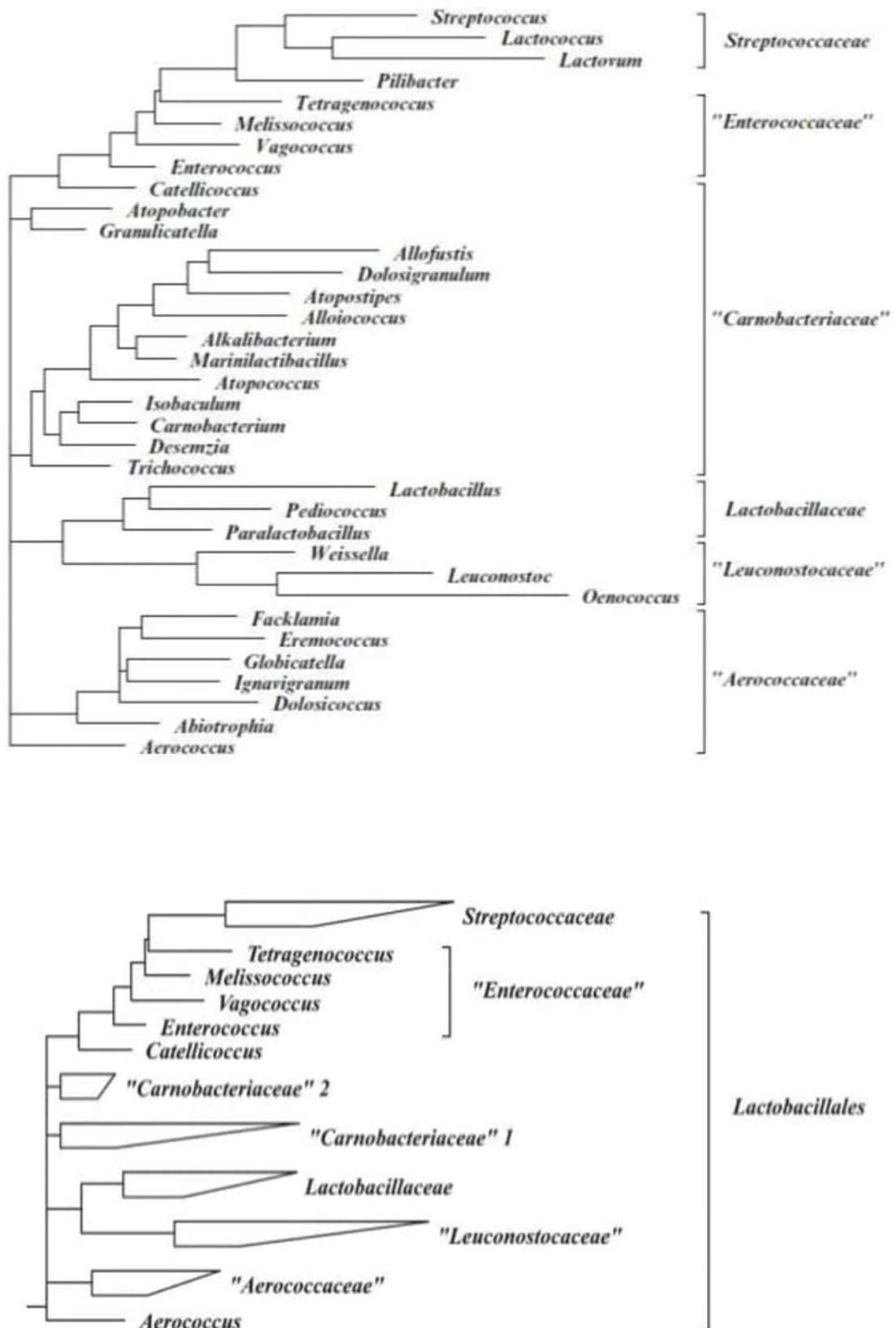


Figure 3: Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques d'ordre Lactobacillales basé sur la comparaison des séquences du gène de 16S d'ARNr (Bergey's manual of systematic bacteriology ,2009)

II.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

Six genres de bactéries lactiques sont associés au lait et aux produits laitiers) ; il s'agit de Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus et Enterococcus (Bulut, 2003).

II.4.1. Lactobacillus :

C'est l'un des plus importants genres de bactéries lactiques. Il appartient à la famille des Lactobacillaceae contenant aussi les genres Paralactobacillus et Pediococcus. Il comprend 96 espèces et 16 sub-espèces qui sont adaptées à des endroits spécifiques et ne sont pas trouvées généralement en dehors de leurs habitats (De Vos et al., 2009).

Elles exigent toutes de nombreux facteurs nutritionnels pour leur croissance. Pour cela, tous les milieux de culture utilisés pour l'isolement sélectif ou semi sélectif des lactobacilles (MRS, le milieu APT et le milieu SL...) doivent contenir des facteurs de croissance adéquats (De Vos et al., 2009).

Toutes les espèces de Lactobacillus ont une morphologie caractéristique en bâtonnet. Leurs cellules peuvent être longues et minces, courtes, courbées, coccobacilli ou coryneformes (De Vos et al., 2009).

En se basant sur le caractère fermentaire, Kandler et Weiss (1986) ont proposé une classification des lactobacilles en trois groupes:

Groupe I: anciennement appelé Thermobacterium. Il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique, elles se développent à 45°. (Bottazzi, 1988).

Groupe II: anciennement appelé Streptobacterium. rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (Bottazzi, 1988).

Groupe III: anciennement appelé Betabacterium. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire, la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO₂ celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. ces bactéries possèdent une phosphokétolase (Tableau (4) .

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. Les cellules sont courtes.

Tableau 2: Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (Sharpe,1981 ; Kandler et Weiss1986)

Caractéristiques	Group I, homofermentaires Obligatoires	Group II, hétérofermentaires Facultatifs	Group III, hétérofermentaires Obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

Notes :

+ : Positif ; - : négatif ; FDP : Fructose 1-6 diphosphate aldolase

II.4.2. Lactococcus :

Le genre *Lactococcus* fait partie de la famille des Streptococcaceae comprenant aussi *Streptococcus* et *Lactovum*. Il rassemble cinq espèces dont les exigences nutritionnelles sont complexes et variables: *Lc. graviae*, *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. piscium* et *Lc. plantarum*. Elles sont des habitantes typiques des plantes, des animaux et des produits dérivés de ces organismes (**De Vos et al., 2009**). Pour leur isolement, une variété des milieux complexes est utilisée (gélose au sang, le milieu Elliker, M17...). Après une incubation qui dure de 1 à 2 jours, des colonies petites, translucides à blanchâtres, lisses et circulaires sont formées (**De Vos et al., 2009 ; Dahou et al., 2021**).

Les cellules de *Lactococcus* sont sphériques ou ovoïdes, isolées, en paires ou en chaînes. Elles sont non hémolytiques, aéro anaérobies facultatives à microaérophiles. Elles sont toutes mésophiles, la température optimale de croissance varie de (10 à 40°C)

Les lactococci sont des bactéries homofermentaires qui produisent de l'acide lactique L(+) à partir de glucose. Ils croissent bien à des valeurs proches de la neutralité dans les milieux tamponnés, mais ils s'arrêtent de croître lorsque le pH atteint 4.5 (De Vos et al., 2009)

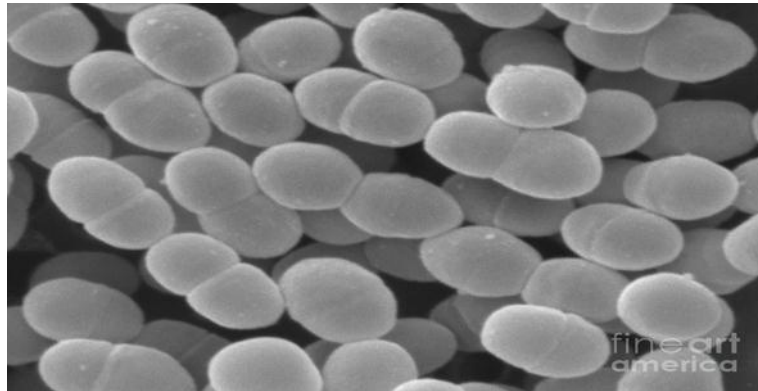


Figure 4: Morphologie de *Lactococcus lactis* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000) (Teubeur et Geis ,2006).

I.4.3. Leuconostoc, Oenococcus et Weissella

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et à température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella*. Ce sont des bactéries hétérofermentaires, les hydrates de carbone sont fermentés par les voies de l'hexose-monophosphate et de la phosphokétolase (Corrieu et Luquet, 2008; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

Récemment, certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

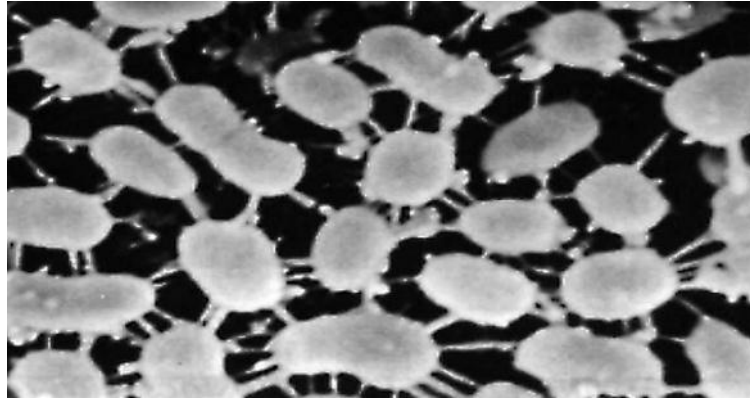


Figure 5 Fixation des *Leuconostocs* sur les moules en grès-vernissé .

II.4.3. Pediococcus et Tetragenococcus

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement entétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

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

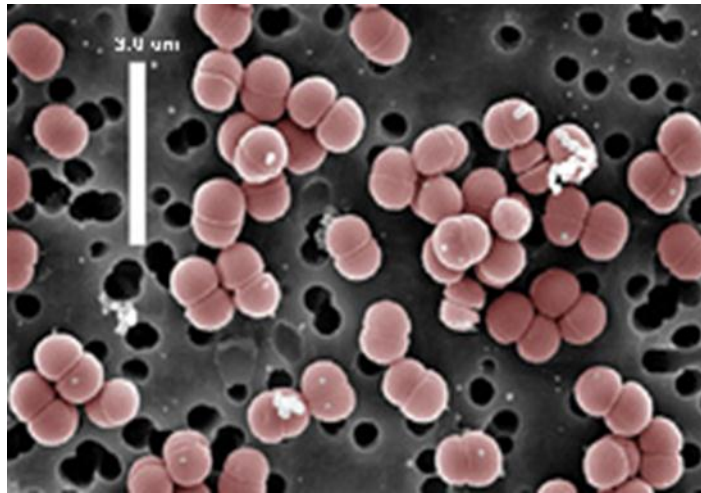


Figure 6: Morphologie de *Pediococcus pentosaceus* en microscopie électronique à transmission (wallace *et al* ,2003)

II.4.4. Streptococcus

Ce genre est associé à de nombreuses maladies humaines et animales et la seule espèce qui est adaptée à l'environnement laitier est *Streptococcus thermophilus* (Chandan *et al.*, 2008).

Cette espèce rassemble des cellules ovoïdes ou sphériques, d'un diamètre variant de 0.7 à 1µm, arrangées en paires à longues chaînes, aéro anaérobie facultatives. Elles croissent à 45°C mais non à 15°C et la plupart des souches survivent après un chauffage à 65°C pendant 30 minutes. (Vos *et al.*, 2009).

Toutes les souches de *S. thermophilus* exigent les vitamines de groupe B et quelques acides aminés pour leur développement. Elles sont incapables d'hydrolyser l'esculine, les caséines, la gélatine, l'hippurate et l'arginine. Certaines souches peuvent hydrolyser l'amidon. Elles produisent de l'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer), la β . galactosidase et la leucine arylamidase. Mais elles ne peuvent pas synthétiser plusieurs enzymes comme l'uréase, DNase, α . galactosidase, etc. (De Vos *et al.*, 2009).

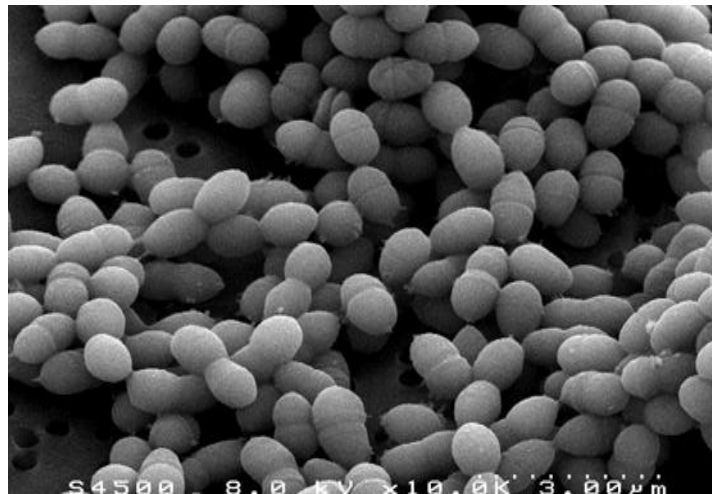


Figure 7: Morphologie de *Streptococcus thermophilus* observé au microscope électronique a transmission (M.E.T.) (x 10000) (Liebefeld, 2002).

II.4.5. Enterococcus

Il appartient à la famille des Enterococcaceae qui renferme trois autres genres (*Melissococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*). *Enterococcus* est séparé du genre *Streptococcus* sur la base des résultats d'hybridation (ADN-ADN et ADN-ADNr) qui sont confirmés par les analyses phylogénétiques de l'ARN 16S (De Vos et al., 2009).

Plusieurs espèces font partie de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux; d'autres sont isolées à partir des plantes, des eaux et des denrées alimentaires (lait, viande...). Il s'avère que leur présence dans l'eau résulte d'une contamination fécale. Les enterococci croissent dans une variété de milieux de culture riches (Todd-Hweitt, trypticase soja, BHI...). Néanmoins, il apparait que l'MRS défavorise la croissance de quelques espèces. Leurs colonies sont toujours circulaires, régulières et lisses ayant un diamètre qui peut atteindre 5mm. Certaines espèces produisent un pigment caroténoïde jaune sur un milieu solide. Les cellules des entérocoque sont ovoïdes, isolées, en paires ou en courtes chaînes. La présence des flagelles rudimentaires rendent certaines espèces mobiles (De Vos et al., 2009).

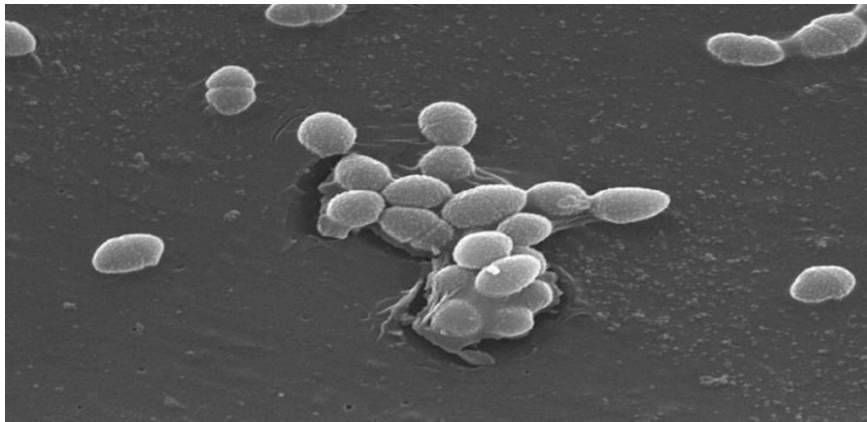


Figure 8 : Morphologie d'Enterococcus faecalis observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000). ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus faecalis](https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis))

II.4.6. Bifidobacterium

I .4.7. Bifidobacterium

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

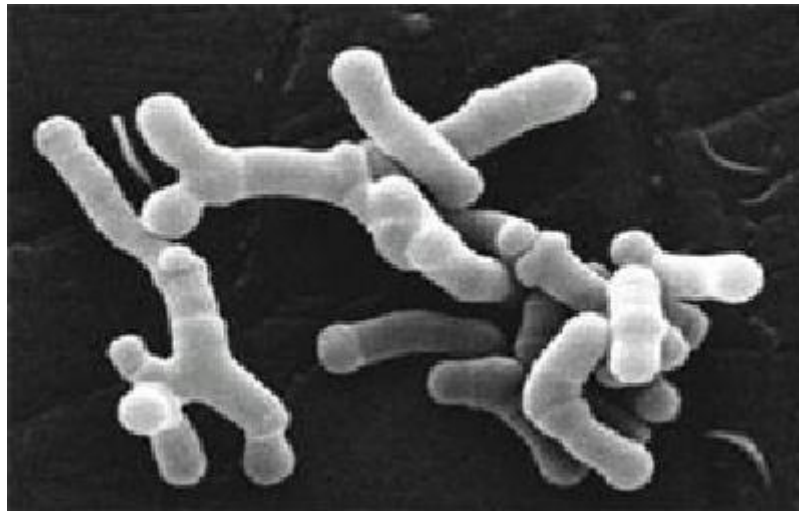


Figure 9: Morphologie de *Bifidobacterium longum* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000) (https://fr.wikipedia.org/wiki/Bifidobacterium_longum).

Tableau 3: Principales caractéristiques des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 2004)

Caractéristiques	Bacilles				Coques			
	Camobacterium	Lactobacillus	Aerococcus	Enterococcus	Lactococcus Vagococcus	Leuconostoc Oenococcus	Pediococcus	Streptococcus
Formation des tétrades								
Production de gaz ^b	+ ^c	±	+	+	±	+	-	-
Croissance à 10°C	-	±	-	+			±	
Croissance à 45°C		±			-	-	±	±
Croissance dans 6,5% NaCL	ND ^d	±	-	-	-	±	±	-
Croissance dans 18% NaCL			-	+	-	-	±	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	+	+	±	±		-
Croissance à pH 9,6					-	-	-	
Acide lactique	L	D,L,DL ^e	L	L	L	D	L,DL ^e	L

Notes:

+ : Positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé. a Weissella peuvent être également sous forme de bacille. b Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+). c Faible quantité de CO₂ produite selon le milieu. d Peuvent ne pas se développer dans 8% NaCL. Production d'acide lactique D, L, ou DL

II.5. Les exigences des bactéries lactiques en nutriments

Si les bactéries lactiques sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnelle, c'est parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (Luquet, 1986).

II.5.1. Glucides

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie (Desmazaud, 1983). Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés. Un métabolisme aboutit de façon quasi-exclusive à la production d'acide lactique (caractère homofermentaire). L'autre peut produire de l'acide lactique, mais également de l'éthanol et de l'acide acétique (caractère hétérofermentaire) (Ghaly et al., 2005).

II.5.2. Azote

Les bactéries lactiques exigent aussi l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (Desmazaud, 1983). Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines du lait, et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieure de la cellule (Desmazaud, 1998).

II.5.3. Vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines (Dellaglio et al., 1994) (Holzapfel et al., 2001).

II.5.4. Minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (Novel, 1993).

II.5.5. Oxygène

Les bactéries lactiques sont communément appelées micro aérophiles. Ainsi, elles tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs en ce gaz peuvent être liées avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit dans la cellule en présence d'air. Il faut éliminer le H₂O₂, car son accumulation devient toxique (Vignola, 2002).

Chapitre II

Rôle des bactéries lactiques

III. Rôle des bactéries lactiques:

III.1. Rôle technologique

✓ Dans l'industrie alimentaire

La fermentation des aliments par les BL est la conversion des hydrates de carbone en acides organiques (acide lactique notamment) (**Von Wright et Axelsson, 2012**).

Intérêt sur la et structure la texture ; les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée; l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides.

Dans la fabrication des aliments, ces bactéries sont utilisées comme agents aromatisants . Elles produisent plusieurs composants tels que les exopolysaccharides, l'acétate, l'éthanol, le diacétyle et acétaldéhyde qui peuvent améliorer la texture, l'arôme et la saveur des produits alimentaires fermentés (**Badel et al., 2011**). Elles acidifient l'aliment, ce qui entraîne un goût d'acide lactique acidulé, elles exercent souvent des activités protéolytiques (**van Kranenburg et al., 2002**). Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme est issu du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyle sont les plus importants (**Desmazeaud et al., 1992**). Les bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (**Thompson et al., 1994**).

En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (**Pfeiler et Klaenhammer, 2007**)

✓ Domaine thérapeutique :

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 restent encore contre versés:

-Améliore la digestion de lactose.

-Le traitement de certaines infections ou diarrhées.

-Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.

-Utilisation dans l'élaboration des vaccins (**Boumediene,2013**).

Certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. (**Salminen et al., 2004**).

III.2. Rôle métabolique

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leurs énergies de la fermentation des substrats carboniques. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que glucose, galactose, ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). (**Atlan et al., 2008**).

III.2.1. Métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques homofermentaires transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces (**Atlan et al., 2000**)

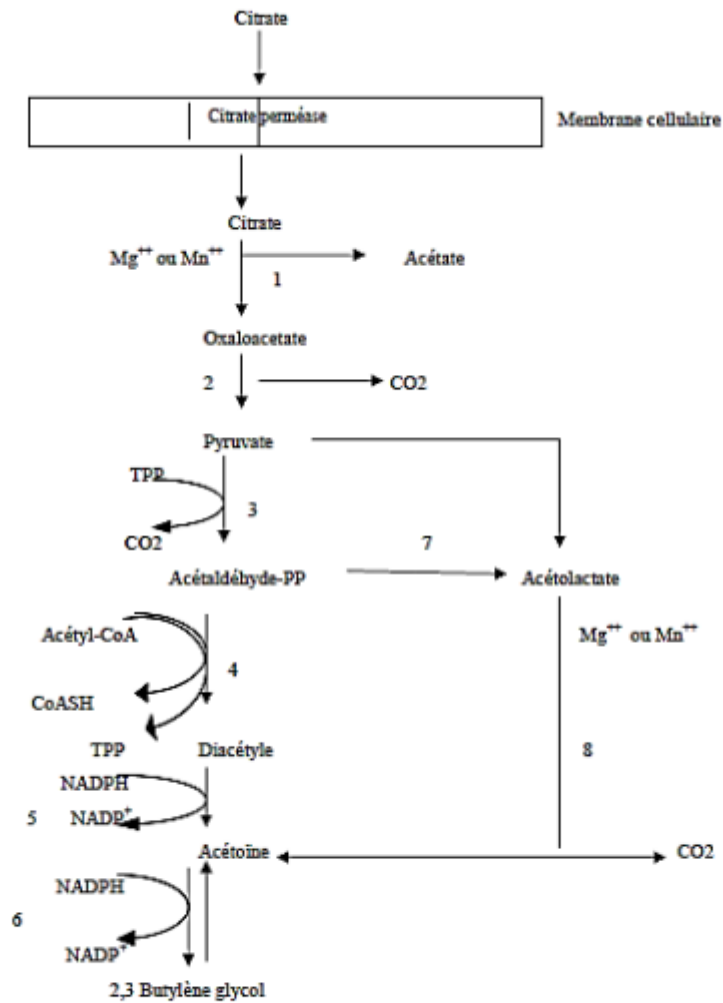
Les bactéries lactiques hétérofermentaires utilisent les voies du galactose-6-phosphate, de la glycolyse et des pentoses phosphates. Le résultat de la fermentation lactique aboutit à la formation des plusieurs constituant comme lactate, d'acétate et de gaz (**Desmazeaud, 1996**).

III.2.2. Métabolisme du citrate

L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. faecium*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (*Ln. lactis*, *Ln. cremoris*) et *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (**Leveau et Bouix, 1993**).

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate lyase.

L'oxaloacetate est ensuite converti en pyruvate et en CO₂ par une oxaloacétate décarboxylase aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini, il permet aussi la production de CO₂ et la formation d'ouvertures dans les fromages (**Bourel et al., 2001**).

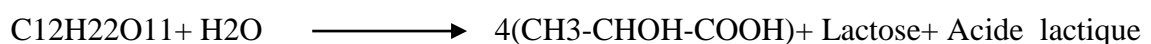


TPP: thiamine pyrophosphate; 1: citrate lyase (citritase); 2: oxaloacétate décarboxylase; 3: pyruvate décarboxylase; 4: diacétyl synthétase; 5: diacétyl réductase; 6: acétoïne réductase; 7: acétolactate synthétase; 8: acétolactate décarboxylase

Figure 10:Le métabolisme de citrate chez les bactéries lactiques (Cogan, 1981).

I.1. Fermentation lactique

La fermentation est un procédé biologique utilise des sources d’hydrate de carbone et donnée comme résultat l’alcool, l’acide lactique, A acétique, A acétone et co2 pour obtenir des aliments des boisson ou des produits susceptibles d’améliorer sa condition.(Kandler, 1983).



- **Les deux voix de fermentation**

La fermentation est divisée en deux grands groupes :

a) Voie fermentation lactique homofermentaire ou (homolactique)

Plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits apparaissent seulement dans des proportions mineures. Pratiquement toutes les bactéries lactiques utilisées comme cultures acidifiantes appartiennent à ce type. (Mozzi et al., 2010).

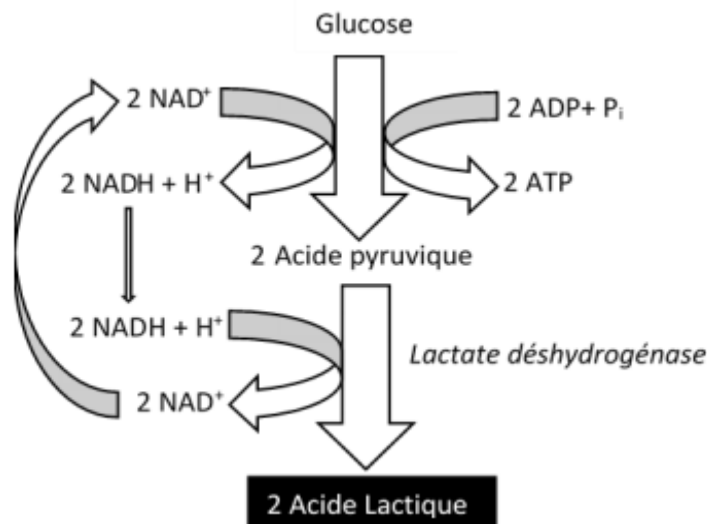


Figure 11: voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier,2007).

B) Voie fermentation lactique hétérofermentaire

Au moins 50%, mais pas plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits issus de cette transformation sont: l'acide acétique, du CO₂ et éventuellement de l'alcool.

Ce type de bactéries lactiques était autrefois employé seulement dans les cultures beurrières, c'est-à-dire pour l'acidification des crèmes et employées lors de la fabrication des fromages à pâte molle et mi-dure car elles peuvent favoriser la formation d'arôme et participer à la création de l'ouverture. (Goy, 2015).

Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Hadef, 2012).

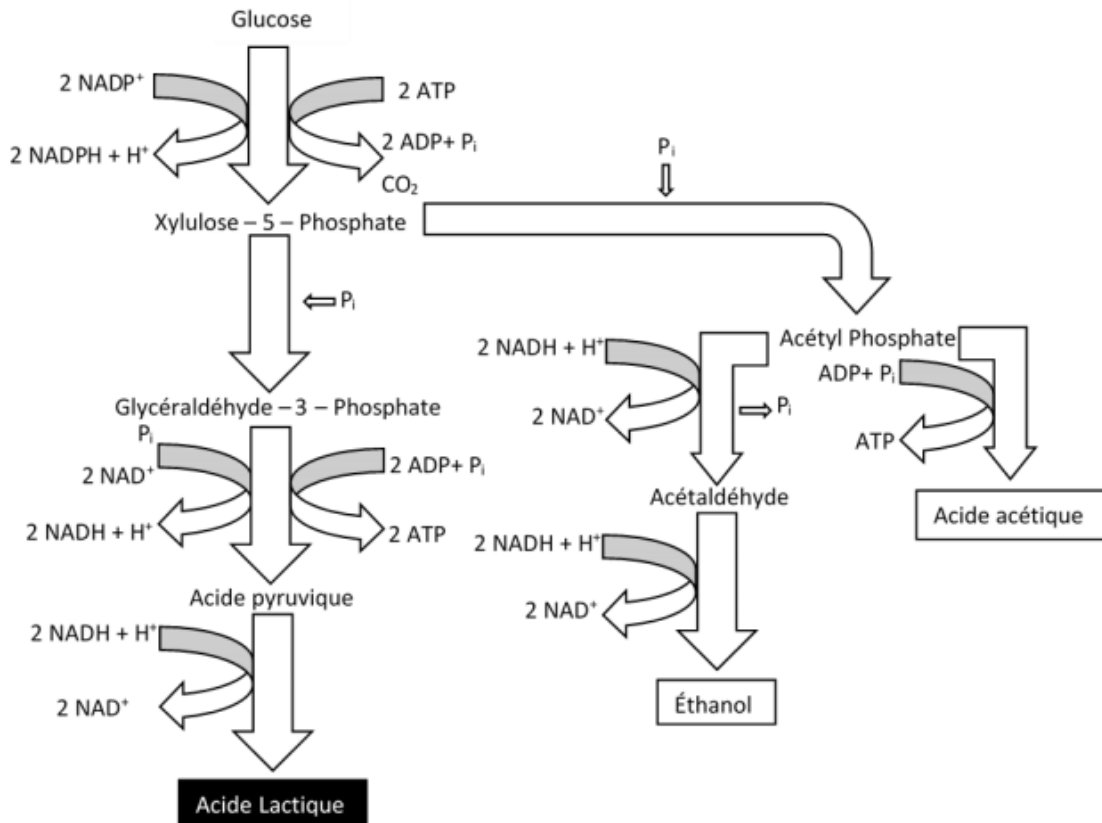
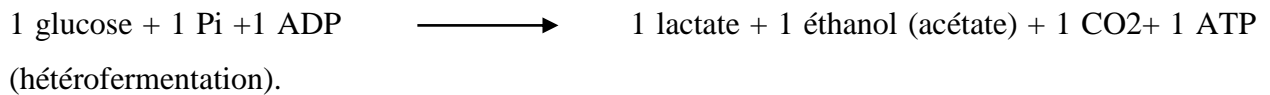


Figure 12: voie métabolique de la fermentation lactique hétérofermentaire (Tessier,2007).

III.3. Les systèmes autolytique et protéolytique

III.3.1. A) Le système Protéolytique:

En dégradant les protéines du caillé par leurs protéases et leurs peptidases, les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la maturation du fromage. Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres, comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe.

Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final.

Dans la plupart des genres de bactéries lactiques (Lactobacilles Lactocoques), le système protéolytique met en œuvre une protéase liée à la paroi cellulaire grâce aux ions Ca^{+2} qui réalise la première étape du processus de dégradation des protéines.

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes ; la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres (Mahi, 2010).

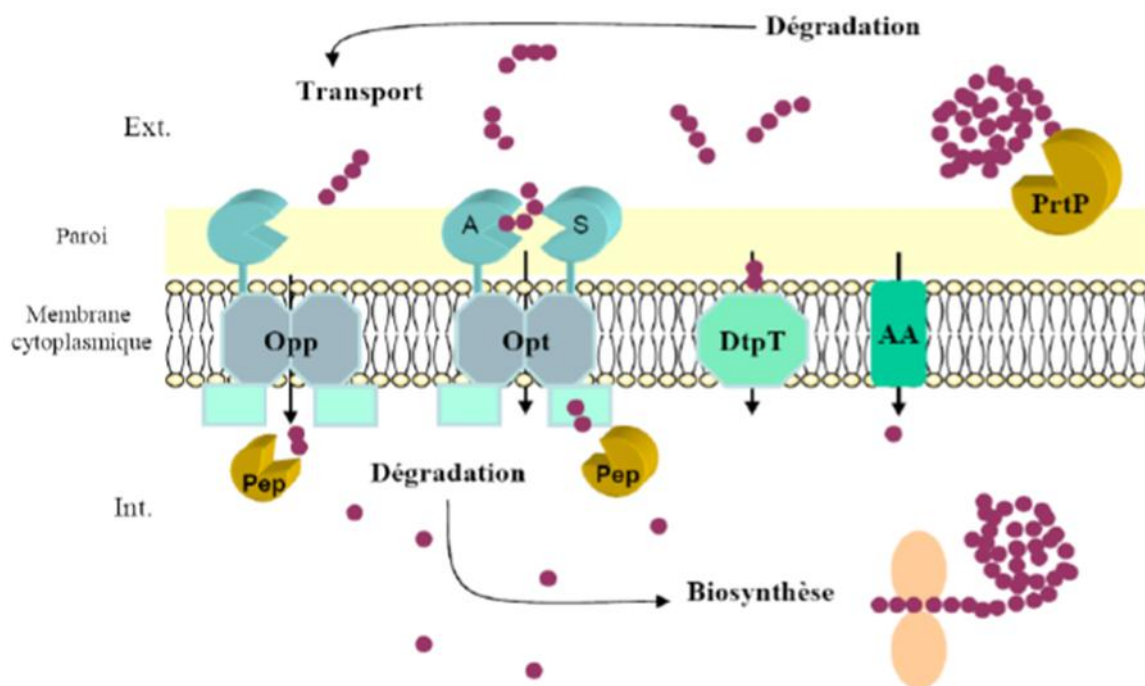


Figure 13: Représentation schématique du système protéolytique chez *Lactococcus lactis*B)

III.4. Le système autolytique

L'autolyse bactérienne peut être définie comme l'éclatement cellulaire. Chez les bactéries lactiques, le phénomène d'autolyse présente un intérêt particulier quant à son utilisation potentielle pour avoir un impact positif sur le développement des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés. Il a été peu étudié chez streptococcus

thermophilus malgré l'importance économique de ce levain qui est utilisé pour la production de yoghourts.

L'autolyse peut être mise en œuvre soit par une autolyse codée par le matériel génétique, soit par une infection par des bactériophages. Les deux processus ont en commun, le fait qu'ils requièrent les enzymes hydrolytiques (amidases et muramidases) qui atteignent la paroi de peptidoglycane soit par excrétion directe, soit par la création de pores via la holine de phage (**Hassaine,2013**).

III.5. Coagulation lactique

La coagulation par voie acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui transforme le lactose en acide lactique. Le pH du lait de fromagerie diminue avec la production d'acide. Ce qui provoque une solubilisation du phosphate et du calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséine. Ces dernières vont se lier entre elles et former un gel cassant très friable et peu élastique (**Mietton, 1995**). Si l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, il y a floculation des caséines à pH 4,6 sous la forme d'un précipité plus ou moins granulé dispersé dans le lactosérum. Par contre, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique, soit par hydrolyse de la gluconolactone, conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (**Mietton et al., 1994**). La teneur en protéines agit sur la coagulation acide. Un lait riche en protéines formera un caillé lactique plus ferme (**Vignola carole , 2002**).

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines du lait. Cette déstabilisation peut être réalisée de deux manières :

- ❖ Voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques contenues dans la flore indigène du lait et/ou apportées sous forme de ferments :

- **Ferments mésophiles**

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C. (**Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010**).

Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. Lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*). (Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010). Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre (Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010).

- **Ferments thermophiles**

Ils comprennent les lactobacilles, les bifidobactéries et l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 40°C et 50°C. Les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Gruyère (Mayra Makinen et Bigret., 2004 ; Carminati et al.,2010).

- ❖ Voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure. Les mécanismes d'action impliqués lors de la coagulation par voie fermentaire ou enzymatique sont très différents au niveau de la micelle de caséine.

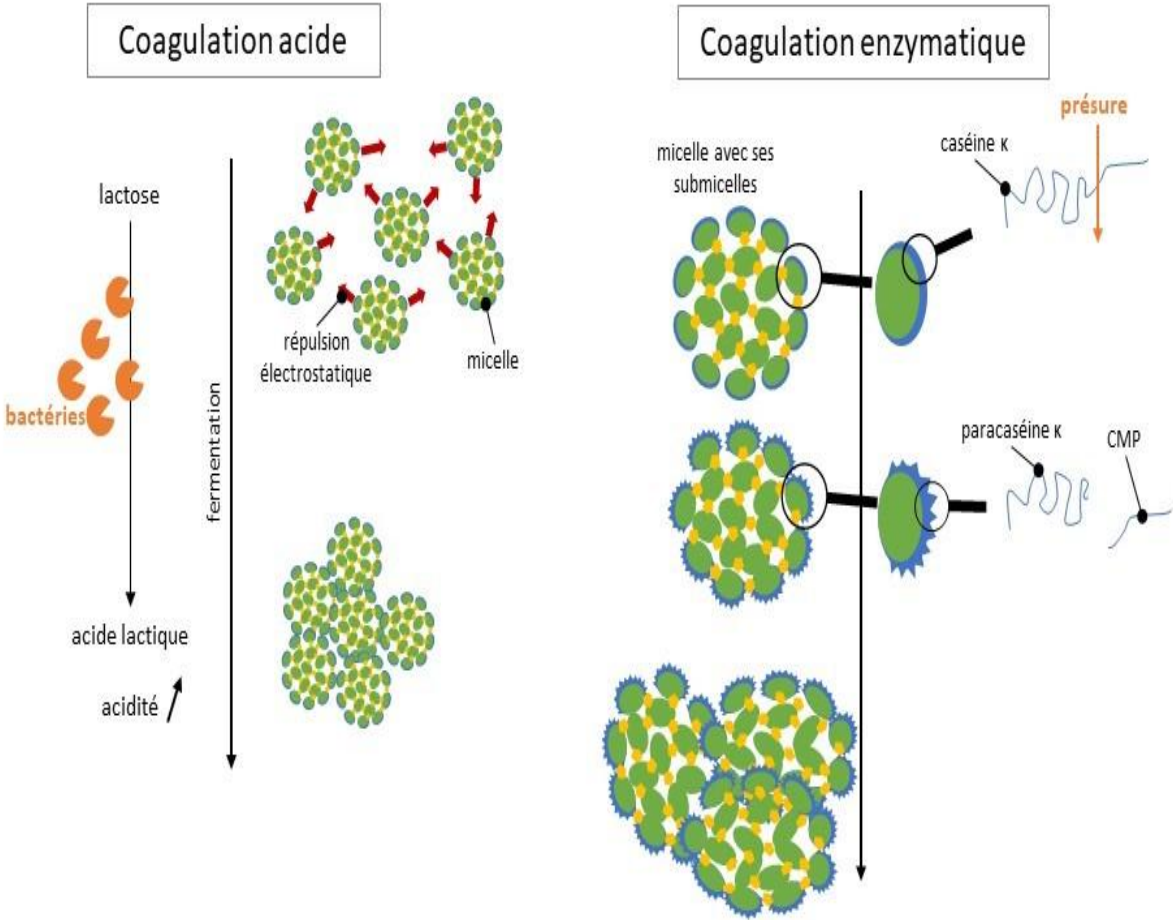


Figure 14: les mécanismes de ces deux types de coagulation de *Le lait et sa coagulation*,
(Florian Ronez)

Partie 2

Etude expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

I. Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude est de tester certaines performances technologiques d'un *Lactobacillus brevis* par la détermination de sa cinétique de croissance et d'acidification avec son activité protéolytique pour un éventuel usage en transformation fromagère.

- ✓ **Lieu** : Laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mostaganem et au laboratoire des sciences et technique de production animale
- ✓ **Date** : du 6 Mars au 30 Avril 2022

II. Matériel et produits du laboratoire :

- ✓ **Produit animal** : Le lait (est un lait reconstitué base poudre de lait low-heat, origine de la Nouvelle Zélande et produit en Janvier 2022).
- ✓ **Matériel biologique** : Une culture bactérienne de l'espèce *Lactobacillus brevis* récupérée du souchier du Laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animale de l'Université de Mostaganem.
- ✓ **Verrerie et appareillage** : Le tableau 4 représente la verrerie et l'appareillage utilisé dans notre étude expérimentale.
- ✓

Tableau 4: Verrerie et appareillage utilisé dans notre étude expérimentale

Appareillage	Verreries et autres
Microscope optique	Boite de Pétri
Incubateur	Lame et lamelle
Agitateur	Anse platine
Autoclave	Pipette Pasteur
Bec bunsen	Passette
Bain marie	Tube à essai
Etuve	Bougie
Réfrigérateur	Flacon stérile
Bacto-scan et Lactoscan	Jarre
PH-mètre	Burette
Balance électronique	Pipette jaugée
	Bécher
	Papier filtres
	Papier aluminium

- ✓ **Les produits et les milieux de cultures** utilisés dans notre travail sont cités dans le tableau suivant :

Tableau 5: les produit les Produits et milieux de cultures utilisés

Produits	Milieux de cultures et autres
Eau oxygénée	Milieu MRS
Eau distillée	Milieu PCA
Lugol	Milieu Gibson-Abdelmalek
Coloration de violé de Gentiane	Milieu MRS et lait
Safranine	Milieu PCA et lait
L'huile a immersion	Bouillon MRS et PCA
Réactif VP1 ;VP2	Bouillon Lactobacillus acidophilus
Phénolphtaléine	
NaOH	
Alcool	

III. Méthodes :

III.1. Culture et identification du *Lactobacillus brevis* .

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant:

- ✓ **Le matériel biologique :**
- 01 souche de bactérie lactique: 01 *Lactobacillus brevis* du soucier du laboratoire de recherche.
- ✓ **Milieux de culture :** Milieux d'isolement. MRS ; PCA .

Tableau 6: Milieux spécifiques utilisés et conditions d'incubation pour le contrôle de la pureté de la souche.

Micro-organismes	Milieux d'isolement	Température °C	Durée	Incubation
Lactobacilles	PCA enrichi pH = 6 et 5,5	37 et 45	72 heures	Anaérobiose
Lactobacilles	MRS pH = 6 et pH = 5,5	37 et 45	72 heures	Anaérobiose

IV. Ensemencement

L'ensemencement des boîtes Pétri de *Lactobacillus brevis* s'est fait dans la masse; les boîtes de Pétri ont été après incubées dans une jarre d'anaérobiose à 35 °c-37°c pendant 72 h .



Milieu PCA



Milieu MRS

Figure 15: Ensemencement de la souche *Lactobacillus brevis* dans différents milieux .

V. Repiquage et purification

V.1. Revivification de la souche lactique :

La souche lactique ayant subi une longue conservation a été revivifiée en procédant comme suit :
On ensemence 100 µl de la souche conservée dans un tube contenant 5 ml de bouillon PCA ou MRS et 10 ml de lait écrémé suivie d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.
Les résultats de revivification ont été appréciés par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

V.2. Purification de la souche

La souche lactique revivifiée a été purifiée par ensemencement par stries sur gélose MRS et incubée à 37°C pendant 24 à 72 heures en anaérobiose.
Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un résultat uniforme de point de vue morphologie des bactéries lactiques, nous renseignant sur leurs caractéristiques macroscopiques

et microscopiques concernant leur aspect (taille, forme et couleur). L'observation de la pureté a été complétée par un test de la catalase.

VI. Conservation des souches lactiques :

L'objectif de la conservation d'une souche pure est le suivant: maintenir la souche pure à conserver viable, disponible et à l'identique. Dans l'absolu, conserver à l'identique, c'est conserver à l'identique le génotype. En pratique, on ne peut vérifier l'absence totale de modification du patrimoine génétique d'origine de la souche pure lors de la conservation ; on se contente de maintenir à l'identique un ensemble de caractères génétiques et/ou morphologiques et/ou physiologiques et/ou biochimiques qui caractérisent la souche pure à conserver et qui sont d'intérêt pour les utilisateurs de la souche (les caractères sont définis par l'utilisateur en fonction de la nature de son travail sur la souche à conserver). La conservation doit évidemment exclure les contaminations (**Champagne et al., 2000**).

Selon les cas pratiques, les durées de conservation nécessaires varient de quelques jours à plusieurs années et le choix d'une technique de conservation doit tenir compte de ce paramètre de durée (**Champagne et al., 2000**).

VI.1. Méthode de conservation :

✓ Congélation -18°C

On conserve congèle en présence d'additifs cryoprotecteurs comme le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou le glycérol à des concentrations de l'ordre de 30 à 50%. Ces additifs pénètrent dans les cellules et abaissent la température de congélation largement en dessous de -18°C (ainsi avec 67% de glycérol, la température de congélation est abaissée à -46°C).

Leur action protectrice est due au fait qu'ils empêchent les cristallisations dans les conditions du refroidissement.

Cette Méthode est adaptée pour des conservations de l'ordre de 1 à 3 ans.

✓ Conservation à court terme:

La conservation à court terme des isolats purifiés, est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation on verse une quantité de glycérol sur la culture bactérienne pour ralentir d'une part leur métabolisme en association avec la température et comme moyen de protection contre les changements de températures, les tubes sont placés à (+4°C), où ils peuvent être conservés pour plusieurs semaines. On l'utilise généralement pour prévenir d'éventuelles

contaminations des cultures, ou dans le cas de pertes des souches (**Kihal et al., 1996**).

✓ **Conservation à longs terme :**

Pour une conservation à long terme, les cultures pures sont centrifugées à 5000 trs/min pendant 5 min, elles sont lavées au tampon phosphate puis ré-centrifugées à 3000 trs/min pendant 3 min. Les culots sont maintenus en suspension dans un milieu contenant 10% de lait écrémé (enrichie par 0,05% d'extrait de levure) et 30% de glycérol déposées à une température de (-20°C). Au fur et à mesure des besoins, les cultures sont décongelées rapidement et repiquées dans du lait avant utilisation (**Samelis et al, 1994**). Cette méthode nous permet d'avoir une collection de souches que l'on peut utiliser à volonté suivant la nécessité de l'application (**Champagne et al., 2000**).

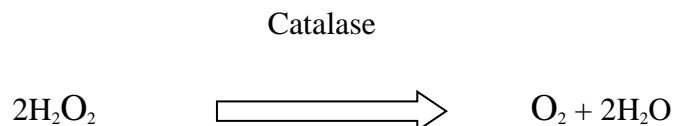
VII. Identification

VII.1. Tests biochimiques :

VII.1.1. Test de catalase :

✓ **Test de la production de la catalase :**

La catalase est une enzyme respiratoire produite par les bactéries aérobies strictes ou facultatives. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) selon la réaction suivante:



Pour procéder au test catalase, on a prélevé une colonie bien isolée, qu'on a étalée avec l'anse de platine sur une lame qu'on va dissocier sur une goutte d'eau oxygénée à 10%. La présence de catalase s'annonce par une effervescence qui indique une formation de bulles d'air, dues à la dégradation de l'eau oxygénée. On conclut que notre souche est une bactérie lactique, si le test de la catalase est négatif. (**Guiraud, 1998 ; Prescott, 2003**).

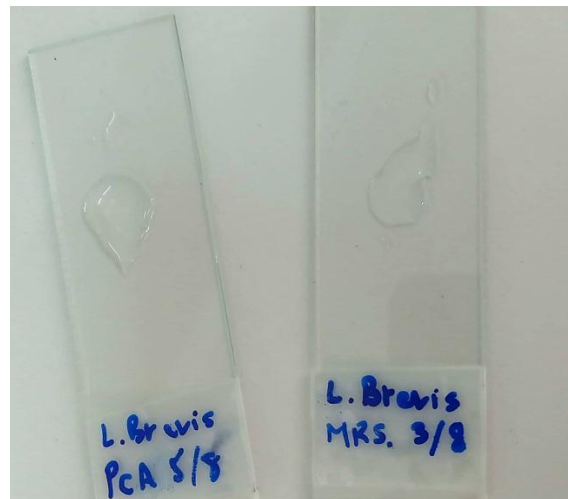


Figure 16: le test catalase de souche *lactobacillus brevis*

VII.1.2. Coloration de gram :

Pour confirmer que notre bactérie est bien lactique, on réalise la coloration de gram (voir méthode en annexe) à partir des colonies bien isolées.

VII.2. Observation macroscopique et microscopique :

L'observation macroscopique et microscopique a été définie selon les critères d'observation morphologiques de la souche lactique utilisée (protocole défini sur le tableau 7 du laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animale LSTPA).

Tableau 7: Critères d'observation morphologiques de la souche lactique utilisée.

Macro-morphologie	Micro-morphologie	Température °C	Groupes
Petites colonies blanches rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets Et en chaînettes	37 à 45	Lactobacilles

VIII. Etude des aptitudes technologiques de la souche lactique « *Lactobacillus brevis* »**VIII.1. Etude de la cinétique de croissance du *Lactobacillus brevis* :**

La production d'acide lactique attribue au lait une acidification qui est plus ou moins importante en fonction de la souche lactique. Ce trait est fortement recherché en industrie laitière, il repose sur la capacité de la souche de fermenter du Lactose et de résister à l'acidité du milieu (Guiraud, 1998).

Pour l'étude de la cinétique de croissance on a utilisé un lait écrémé préalablement préparé. La mesure de cette activité est testée à l'aide d'un Bactoscan. . Cette méthode nécessite préalablement l'ensemencement de 10 ml de lait écrémé (dont on a contrôlé l'absence de toute viabilité cellulaire) avec 100 µl de la souche lactique à tester. On a réalisé des lectures toutes les 2H jusqu'à 24H. La numération bactérienne a été finalisée en parallèle par une mesure de l'acidité en °D et du potentiel hydrogène. Pour le contrôle de l'acidité, on verse 2 gouttes de phénolphaléine dans un échantillon de 10 ml de lait et on titre l'acidité avec le NaOH N/9 à l'aide d'une burette sachant que $1^{\circ}\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$.

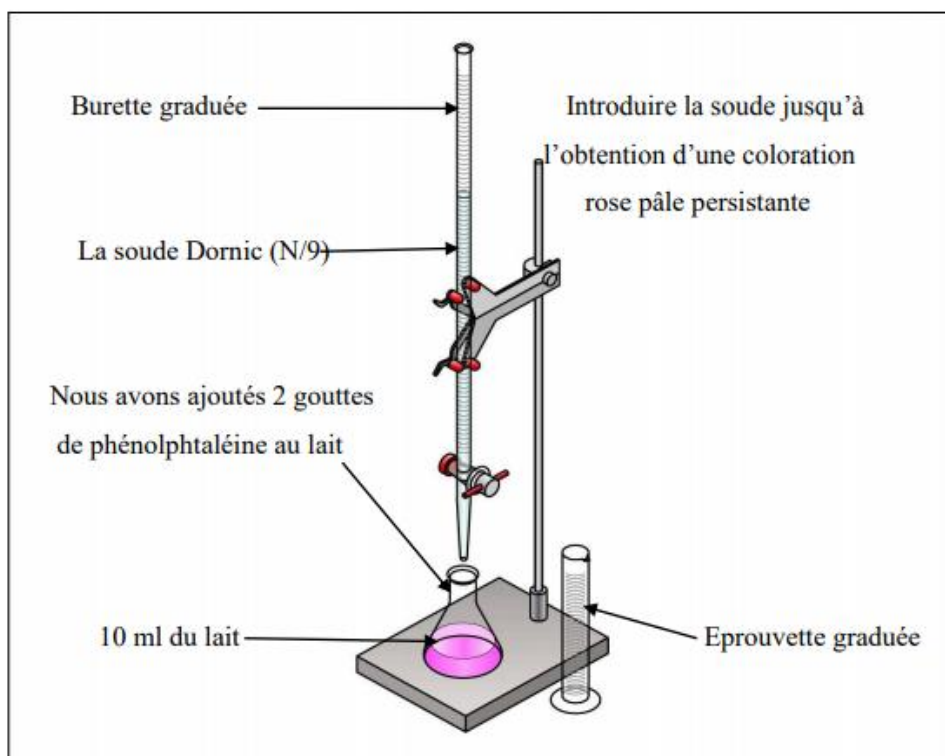


Figure 17: protocole pour la mesure de l'acidité Dornic « Acidimètre ».

VIII.2. Pouvoir acidifiant :

Pour rappel, la mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH de la culture bactérienne étudiée en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude Dornic N/9. On commence par la répartition du lait écrémé dans des flacons stériles et par un ensemencement de nos cultures des souches lactiques. Après incubation à 37°C, à un intervalle du temps 2h, 4h, 6h, 8h et 24h ; 10ml du lait sont prélevés stérilement puis titrer par la soude Dornic (N/9) en ajoutant préalablement 2 à 3 gouttes de Phénolphtaléine à 1% (alcool), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistante au moins 10 secondes.

L'acidité est déterminée par la formule :

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

V_{NaOH}: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre , en plongeant l'électrode dans le volume du lait.

Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

1°D =0,1g d'acide lactique dans 1litre de lait. (**Dornic Pierre dans Guiraud ,1998**).

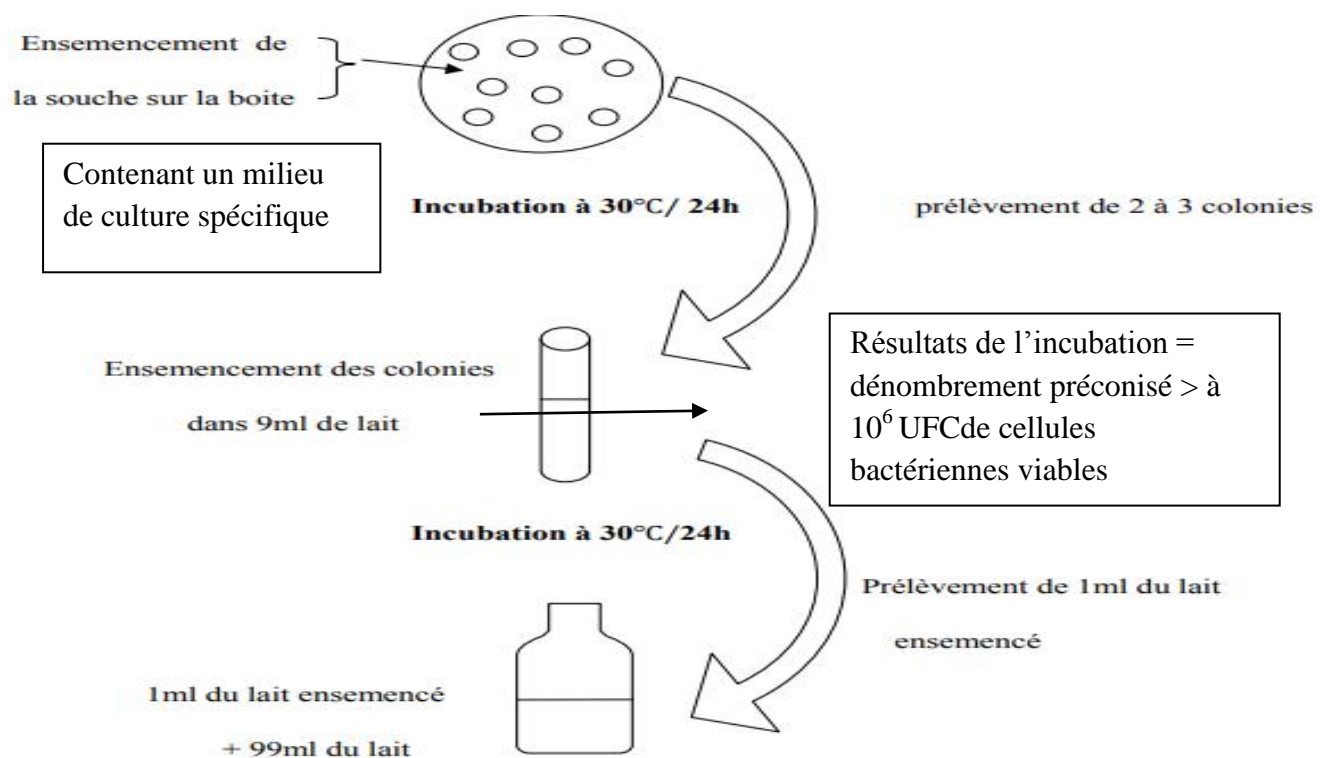


Figure 18: le protocole à suivre pour la réalisation du test d'acidité

VIII.3. Production d'acétoïne :

La production d'acétoïne est testée sur milieu **Clark et Lubs**. En effectuant sur celui-ci, après 24h d'incubation la réaction de Voges-Proskauer (VP). Dans un tube à essai, 5ml de cette culture a été complétée avec 0,5 ml de réactif α - naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2). On a agité soigneusement les tubes et on a laissé 5 à 10 min à température ambiante. Le test s'est traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, après 10 min comme déjà établi par (**Raynaud et al., 2016**).

VIII.4. Pouvoir protéolytique:

Pour déterminer l'activité protéolytique de la bactérie lactique étudiée on a utilisé dans ce test des milieux PCA et MRS à différentes concentrations de lait écrémé enrichi en protéines laitières (à 1%, 2% et 3%) qui ont été coulés, solidifiés et séchés dans des boîtes Pétri. Puis on aensemencé notre souche lactique étudiée à l'aide de la technique des multipoints, chaque disque a reçu un volume de 20 μ l de notre culture de *Lactobacillus brevis*; ensuite on les a incubé à 37°C pendant 24 heures.

VIII.5. Recherche du type fermentaire de la bactérie lactique étudiée :

Ce test nous a permis de déterminer le profil fermentaire de notre souche lactique étudiée en la caractérisant parmi les bactéries lactiques homofermentaires ou hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifier a étéensemencé par notre culture bactérienne par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose MRS stérile a été coulé en surface. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 7 jours. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube.

VIII.6. Essai de fabrication d'un caillé fromager

Un essai de fabrication d'un caillé fromager a été réalisé sur la base d'un lait reconstitué à fromageabilité contrôlé (à l'aide d'un lactoscan IR, pour vérifier la qualité physico-chimique du lait utilisé). Le caillage du lait a été suivi par le contrôle de la coagulation et de ses temps technologiques, du rendement fromager et de l'EST du caillé fromager obtenu.

Chapitre IV

Résultats et discussions

1. Revivification et purification de la souche lactique

Initialement il a été établi la revivification de la souche lactique, sa culture sur le milieu gélosé PCA, l'observation microscopique et la caractérisation de son appartenance aux bactéries lactiques par le test de catalase et par coloration de Gram.

✓ Examen macroscopique

L'observation à l'œil nu des cultures sur gélose PCA a révélé des colonies visibles, de taille similaire (environ 1 mm de diamètre).

✓ Examen microscopique

L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram, sur une culture, Elle nous a permis de décrire la forme des cellules, leur mode d'association, après réalisation des frottis colorés. On observe que l'espèce bactérienne *Lactobacillus brevis* est de forme bâtonnet (en bacille), soit associée par paires, ou en chaînette de longueur variable avec des extrémités arrondies. Cette description confirme les résultats donnés par (Carr et al., 2002 et Dahou et al., 2017)



Figure 19: Observation microscopique après coloration de Gram du *Lactobacillus brevis*.

✓ Test de la catalase

La souche examinée a présenté une catalase négative. Ce test a permis de confirmer l'appartenance de cette souche autochtone aux bactéries lactiques (Marchal et al., 1991).

2. Etude la cinétique de croissance en milieu lait

La cinétique de croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide (Guiraud, 1998). Dans notre étude nous avons utilisé un milieu liquide représenté par du lait low-heat à 12% d'EST. Sur la cinétique de croissance, on a obtenu les six (06) phases de la croissance du *Lactobacillus brevis* et avec comme résultats ce qui suit :

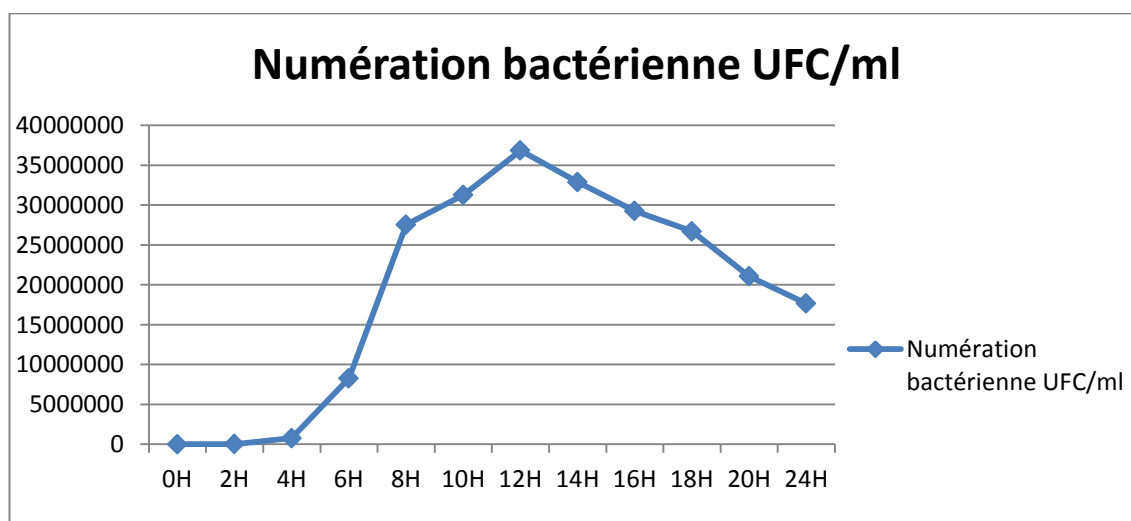


Figure 20: Cinétique de croissance et numération bactérienne du *Lactobacillus brevis*

De T0-T3 on constate que le nombre de cellules est constant identique au nombre initiale. On conclut que c'est la phase de latence donc c'est une période d'adaptation au nouveau milieu.

De T3-T5 on observe un déclenchement à faible vitesse de la croissance bactérienne. C'est un départ d'adaptation.

De T5-T12 on voit une accélération remarquable de la masse microbienne. Le taux de croissance bactérienne est arrivée à l'apogée 36857000 UFC /ml, donc c'est la phase exponentielle.

De T12-T24 on constate une lente décroissance arrivée jusqu'à 17659000 UFC /ml. C'est la phase de déclin.

3. Etude des aptitudes technologiques de la souche lactique « *Lactobacillus brevis* »

✓ Etude la croissance d'acidification

Pour rappel, la mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH de la culture bactérienne étudiée en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude Dornic N/9.

Le suivi de l'évolution du pH et de l'acidité a été assurée en fonction du temps soit à t=0h, t=2h, 4h, 6h, 8h, et 24h.

◆ **Le pH:** On l'a mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre.

◆ **L'acidité:** On a assuré la mesure de l'acidité par titrage de l'acide lactique par un volume de la soude N/9

Les résultats obtenus sont comme suit sur les figures 18 et 19

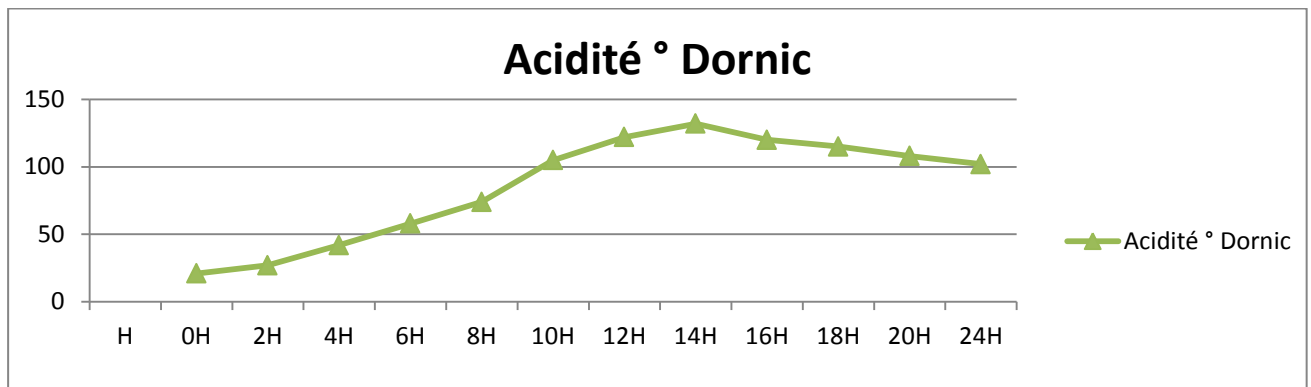


Figure 21: Mesure de la cinétique d'acidification de *Lactobacillus brevis* en ° Dornic

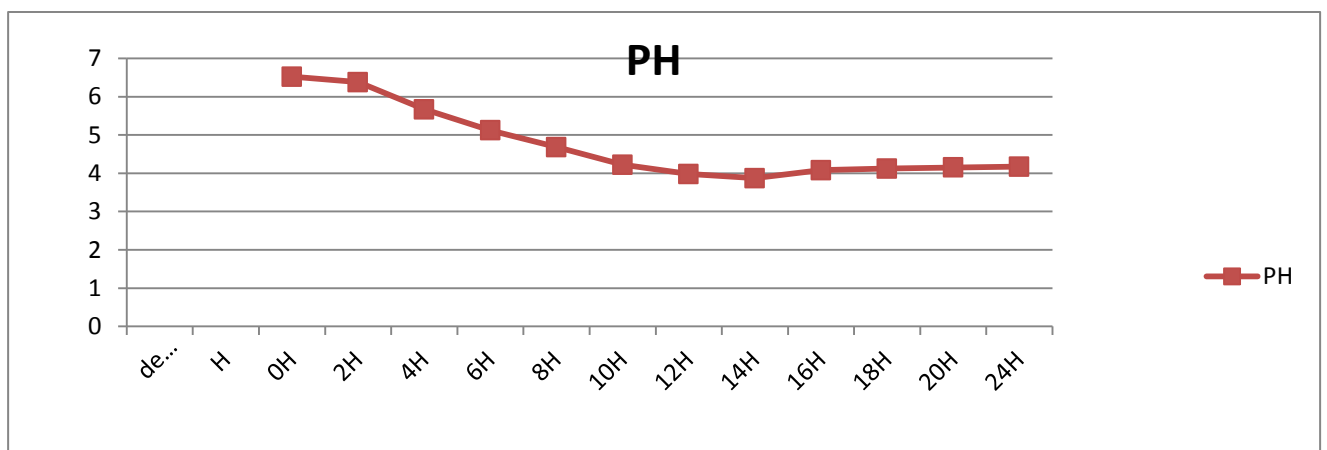


Figure 22: Variation de pH de *Lactobacillus brevis* pendant 24 heures.

- Les figures 18 et 19 ont donné les résultats suivants de l'évolution du pH et de l'acidité °Dornic sur 24 heures et sur un suivi de chaque 2 heures.

D'après la figure 19 un abaissement net du pH à partir de la première heure jusqu'à 12h et devient plus ou moins stable à partir de la 16^{ème} heure de suivi.

A l'opposé, d'après la figure 18 le taux d'acide produit par la souche est accéléré dès la première heure jusqu'à la 14^{ème} heure. A 14heures, la production d'acide est arrivée au sommet dépassant les 100°D, et commence lentement à diminuer après 16 heures.

On peut constater que quand le pH diminue l'acidité °D augmente : le pH isoélectrique et la production d'acide lactique assure une bonne coagulation lactique d'où obtention d'un caillé ferme et non friable. Cela est remarqué à 100°D et à pH 4,6 soit après 10 heures d'incubation.



Figure 23: Coagulation lactique avec *Lactobacillus brevis* repurifié

Les bactéries lactiques sont reconnues par leur pouvoir acidifiant. Dans notre étude d'appréciation du profil technologique, nous avons testé une souche d'intérêt technologique « *Lactobacillus brevis* », en suivant d'une part sa cinétique de croissance, l'évolution du pH , et son pouvoir acidifiant (en °Dornic) en fonction du temps. D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la souche lactique étudiée a un pouvoir acidifiant appréciable, une cinétique de croissance appropriée à la transformation fromagère, et une production d'acide lactique progressive et en fonction du temps. Cette acidité produite accompagnée d'un abaissement du pH du lait provoque une coagulation lactique appréciée pour la fabrication des caillés lactiques.

Notre souche lactique étudiée a donné les résultats technologiques escomptés comme suit :

- Une évolution exponentielle en numération bactérienne de 520 ufc/ml (à 0H) à $35 \cdot 10^6$ ufc/ml (après 12 heures d'incubation contrôlée) ;
- Une évolution en cinétique d'acidification en °Dornic de 21°D (à 0H) à plus de 100°D (après 10 heures d'incubation contrôlée) ;
- Une évolution en pH de 6,52 (à 0H) à Ph isoélectrique 4,6 (après 10 heures d'incubation contrôlée).

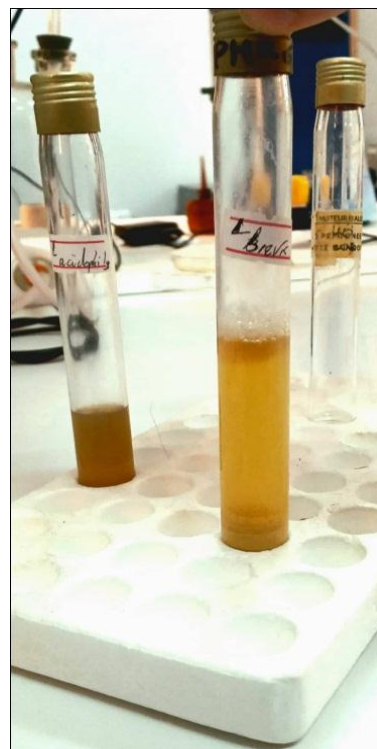
✓ Production d'acétoïne

La production de composés d'arômes par l'espèce bactérienne étudiée est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers. D'après la figure 21, il apparaît que *Lactobacillus brevis* arrive à produire des arômes (acétoïne) comme le confirme la formation de l'anneau rouge, c'est ainsi que grâce à ce pouvoir aromatisant, cette espèce lactique contribuera aux caractéristiques organoleptiques de l'essai de fabrication du caillé fromager (Cholet, 2006).

Des résultats similaires sur des lactobacilles hétérofermentaires, ont été rapportés par (Leroy et De Vuyst, 2004) et Raynaud *et al.*, (2016). Par ailleurs, (Monnet *et al.*, 2008) ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne. Cette dernière est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), elle peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique.



Avant



Après

Figure 24: Production d'acétoïne

✓ Pouvoir protéolytique

Le résultat obtenu est un halo de protéolyse au tour de la culture bactérienne dont on a mesuré le diamètre pour évaluer l'intensité de l'activité protéolytique (Moulay *et al.*., 2006). Si la bactérie commence à dégrader les protéines lactières donc elle est protéolytique.



Figure 25: Activité protéolytique du *Lactobacillus brevis* à 1%

- *Diamètres de protéolyse obtenue sur les points de la culture bactérienne:*

$$1 = 3 \text{ mm}$$

$$2 = 5 \text{ mm}$$

$$3 = 7 \text{ mm}$$

$$4 = 9 \text{ mm}$$

$$\text{Moyenne} = 6 \text{ mm}$$

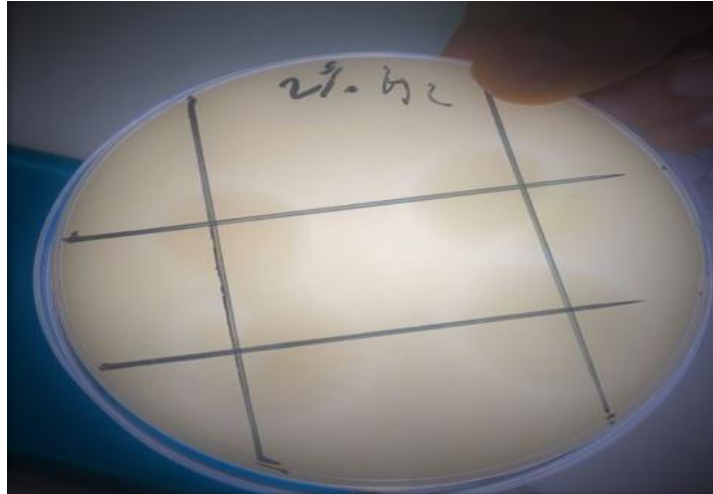


Figure 26: Activité protéolytique du *Lactobacillus brevis* à 2%.

- Diamètres de protéolyse obtenue 2% sur les points de la culture bactérienne :

$$1 = 22 \text{ mm}$$

$$2 = 9 \text{ mm}$$

$$3 = 10 \text{ mm}$$

$$4 = 0 \text{ mm}$$

$$\text{Moyenne} = 10.25 \text{ mm}$$

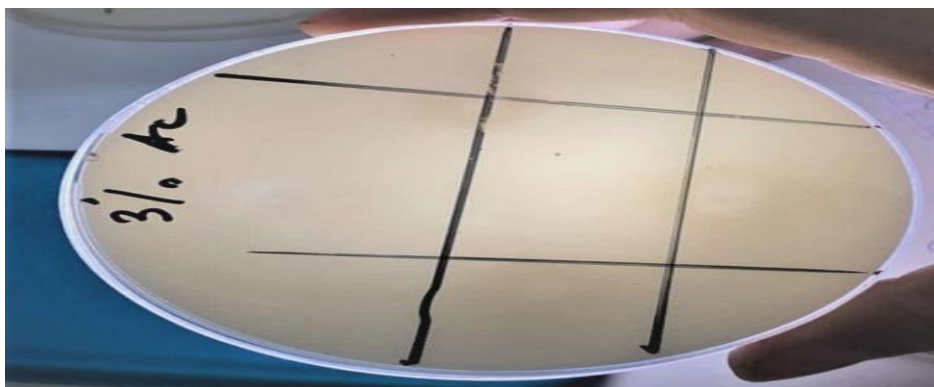


Figure 27: Activité protéolytique du *Lactobacillus brevis* à 3%.

- *Diamètres de protéolyse obtenue 3% sur les points de la culture bactérienne:*

$$1 = 21 \text{ mm}$$

$$2 = 25 \text{ mm}$$

$$3 = 22 \text{ mm}$$

$$4 = 9 \text{ mm}$$

$$\text{Moyenne} = 19.25 \text{ mm}$$

Selon **J.C Veuillemard ,1986**, on peut classer la souche comme protéolytique si il y'a une apparition d'un halo autour de la colonie bactérienne incluse entre 5 et 15 mm. En comparant avec ces données, on peut dire que la souche est fortement protéolytique dans la concentration de 1% , est moyennement protéolytique à 2% et faiblement protéolytique à 3% .

- ✓ L'activité protéolytique est importante dans la fabrication fromagère.
- ✓ L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques nécessaires à la maturation des fromages.

L'analyse de ces résultats obtenus fait ressortir que la souche étudiée a une excellente croissance avec une très bonne activité protéolytique qui s'est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques aux différentes concentrations des protéines lactières utilisées.

Ces résultats sont largement en accord avec ceux obtenus par (**Leclercq-perlat M.N,2011** , **Lefrileux et al.,2016** et **Savijokie et al.,2006**)

✓ **Recherche du type fermentaire de la bactérie lactique étudiée :**

Ce test nous a permis de déterminer le profil fermentaire de notre souche lactique étudiée en la caractérisant parmi les bactéries lactiques homofermentaires ou hétérofermentaires. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube. Nos résultats sont comme suit :



Figure 28: Profil fermentaire après 7 jr d'incubation a 37 °C

- Pour le tube (L.B), on observe un détachement remarquable du bouchon gélosé.

On conclut que le *Lactobacillus brevis* est une bactérie lactique hétérofermentaire avec une production de gaz (CO₂) caractéristique, cette production a entraîné un décollement du bouchon supérieur de gélose déposé sur le milieu de culture Gibson Abdelmalek.

Selon **Lefrileux et al.,2016**, parmi les bactéries hétérofermentaires, on trouve des bactéries des genres *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus* dont *Lactobacillus brevis*.

4. Essai de fabrication d'un caillé fromager :

Le caillage du lait est indispensable dans la fabrication du fromage. Une qualité fromageable est une nécessité pour l'obtention d'un bon caillé fromager. Avant d'entamer l'essai nous avons déterminé par spectrométrie IR (à l'aide d'un lactoscan, la qualité physico-chimique du lait utilisé)

Qualité physico-chimique du lait expérimental (Analyse par Lactoscan)

- pH = 6,72
- Matière grasse : 25 g / litre
- Matière protéique : 33 g/ litre
- Lactose : 46 g/ litre
- Point de congélation : -0,542 °C
- Densité : 1.034 à 20°C

✓ **Coagulation du lait**

Le principe de la coagulation lactique est le changement d'état du lait d'un état liquide à un état demi-solide qui est appelé gel ou coagulum. Le produit se sépare alors en deux phases : le lactosérum et le coagulum. Le lait possède des protéines insolubles, des caséines, responsables de la coagulation par une déstabilisation de la structure micellaire des caséines stable dans un lait frais non altéré (**Abiazar, 2007**) .

✓ **Coagulation acide**

Grâce à un élément chargé positivement et contenant des ions H⁺, les charges négatives des caséines sont neutralisées. L'acide va déshydrater la structure micellaire, les micelles déstabilisées vont donc se rapprocher. Elles se soudent entre elles avec des liaisons fortes et irréversibles. Ces liaisons sont le résultat d'interactions hydrophobes contenant dans ce réseau des globules gras, des micro-organismes, des vitamines, du calcium, etc... On obtient un gel de caillé lactique « coagulum » grâce à ces interactions (**Mietton, 1995**).

✓ **Caractéristiques de la coagulation**

La coagulation lactique est déterminée après une incubation de 24 heures ; du lait préparé ensemencé avec une culture lactique. Un lait riche en protéines formera un caillé lactique plus ferme. La coagulation du lait résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi solide appelé gel ou coagulum (**Cecchinato et al., 2012**).

A pH iso-électrique on détermine la coagulation lactique totale.

La coagulation du lait se caractérise par trois paramètres essentiels :

- temps de floculation : phase primaire
- Le temps de prise : temps de floculation × 2

-La coagulation totale : temps de prise x 4 ; appelée aussi la phase finale : est déterminée par le fromager après un temps de raffermissement en obtenant une coupe franche du caillé au tranchage manuel. Donc la composition du lait influence la coagulation du lait de différentes façons.. Une augmentation du niveau de caséines dans le lait résulte en un temps de coagulation plus court . De Nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait et les caractéristiques physiques des coagulums. Ces facteurs sont principalement liés à la concentration en enzyme, à la température, au pH, à la teneur en calcium, à la teneur en caséines et à la dimension des micelles (Mahaut et al., 2000, Li et Dagleish, 2007).

Nos résultats ont donné ce qui suit pour les trois paramètres essentiels de la coagulation lactique du lait :

- Le temps de floculation : phase primaire en coagulation lactique s'est fait à pH 5,30 à 5,40.
- Le temps de prise : temps de floculation x 2 (en coagulation lactique s'est réalisé à pH 4,8 à 5,0).
- Le temps de coagulation totale (ou vitesse de raffermissement) :
Phase secondaire= temps de prise x 4 (en coagulation lactique s'est établi à pH isoélectrique 4,5 à 4,6).

Nos résultats concordent avec les normes FIL destinées à la transformation fromagère de la famille des caillés fromagers à caractère lactique

✓ **La préparation du coagulum « caillé lactique »**

Pour la préparation du coagulum on a établi la démarche suivante :

Dans un flacon contenant 100 ml de lait préparé on a ajouté 2.5 ml de la culture de *lactobacillus brevis*. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures.

a) Rendement fromager

Pour pouvoir suivre l'évolution du rendement fromager, il est nécessaire de peser le caillé obtenu après la filtration (exsudation du lactosérum) au même stade de coagulation c'est-à-dire après coagulation totale.

✓ **Calcul du rendement fromager**

Le rendement est généralement exprimé en kg de fromage ou de caillé fromager obtenu à partir de 100 litres de lait (voir la formule ci-contre)

$$\text{Rendement (kg/100 l)} = \frac{\text{Poids du caillé fromager (kg)}}{\text{Nombre de litre de lait utilisé}} \times 100$$

0,03907 Kg

$$\text{Rendement} = \frac{0,03907}{0,100} \times 100 = 39.07 \text{ kg/ 100 litres}$$

Selon la fédération internationale du lait (2018) ; le rendement fromager d’un lait pour un caillé fromager lactique varie entre 35 et 40 kg pour 100 litres de lait fromagèable. Notre essai expérimental a donné le rendement escompté pour un caillé frais se situant à une valeur très appréciable de 39.07 kg pour 100 litres.

Un lait apte à une transformation fromagère doit avoir comme taux protéique TP plus de 3% (30 g/L de lait). Notre lait expérimental a présenté un TP supérieur à 3% soit 3,3%. Il faut savoir pour tout point ou gramme de protéine gagnée, on gagnera 4 g de fromage. De plus le profil protéique de notre souche lactique a donné la qualité escomptée en caillé lactique sur le plan rendement fromager et fermeté du coagulum lactique.

b) Détermination de l’extrait sec total (EST)

Cette méthode consiste à une évaporation de l’eau de la prise d’essai dans une étuve (Memmert) à une température de 103°C pendant 3 heures et la pesée du résidu, selon la méthode AOAC 926.08 (F.I.L (2018)). Dans une capsule métallique préalablement séchée, on a pris 5 g du caillé fromager lactique issu d’une acidification- coagulation par la culture de *Lactobacillus brevis* et étaler sur l’aluminium ; qu’on a séché dans une étuve pendant 3 heures à 103°C.

Après dessiccation une pesée a été effectuée pour pouvoir déterminer l’EST du caillé issu de la culture testée.

L’extrait sec total (EST) est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{EST \%} = \frac{\text{C2-C0}}{\text{C2-C0}} \times 100$$

C0 : poids de la capsule = 1,35g

C1 : poids de la prise d'essai avant dessiccation = 5 g

C2 : poids de la prise d'essai après dessiccation = 2.33 g

$$\text{EST} = \frac{2.33 - 1,35}{5 - 1,35} \times 100 = 26.84 \%$$

c) Détermination d'humidité

Pour l'humidité il faut déduire de 100%, l'extrait sec total obtenu :

Soit % Humidité = 100 - %extrait sec total obtenu.

$$\text{Humidité} = (100 - 26.84) \% = 73.16 \%$$

Nos résultats sont conformes à la norme FIL, 2018 : en effet le rendement fromager en extrait sec total a une teneur de 26.84 % et une humidité de 73.16 % soit dans la catégorie des caillés fromagers à caractère lactique qui doivent présenter un rendement en extrait sec entre 20 et 25% et une humidité (teneur en eau) comprise entre 70 et 75 %.

Conclusion

Conclusion

Au cours de cette étude, la souche lactique contrôlée appartenant au genre *Lactobacillus brevis* a fait préalablement l'objet d'une évaluation in vitro quelques caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques et leurs aptitudes technologiques à savoir :

- ✓ Le suivi de la cinétique de croissance, le pouvoir acidifiant.
- ✓ la production d'acide lactique, et l'activité protéolytique.
- ✓ Déterminer de la qualité de la caille fromagère par rapport à son extrait sec, à son humidité, son rendement fromagère.

Les résultats obtenus montrent que l'espèce *lactobacillus brevis* sont des bactéries a Gram positives ; catalase-négatives, non sporulantes, non mobiles, en forme de bâtonnet ou de coccus . *L. brevis* se développe de manière optimale de 30 à 37 °C. C'est une bactérie hétéro-fermentaire obligatoire produisant de l'acide lactique, CO₂ et de l'éthanol et/ou de l'acide acétique

La souche lactique par ses activités acidifiantes et protéolytique a donné les résultats attendus pour une application fromagère.

Dans ce sens, nous avons obtenu un coagulum ferme et un lactosérum clair avec un rendement fromager à 39.07 % pour une coagulation lactique contrôlée à pH isoélectrique et à une acidité Dornic maîtrisable. Avec un rendement en EST de 26.84 %, conforme à une utilisation pour un fromage à caillé lactique et selon les recommandations de la Fédération Internationale des Laites « FIL ».

La maîtrise des préparations fromagères passe initialement par la conformité de la qualité du lait, des bonnes aptitudes technologiques des souches lactiques utilisées et l'adaptation des techniques de transformation fromagère à l'obtention du caillé fromage idéal.

Selon l'intérêt de chaque espèce bactérienne isolée et ses effets sur les plans technologique , cette étude est une contribution qui vise à apporter aux fromagers l'approche scientifique qui assurerait une meilleure connaissance de la souche , qui permettrait ainsi d'apprécier d'autres souches aux propriétés intéressantes en fonctions des aptitudes technologiques et de certifier le fromage selon l'écosystème microbien utilisé.

References

Bibliographiques

– *A* –

- **Abiazar r., 2007** : Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus, thèse AgroParisTech, 142p
- **Alias. C, et Liden. G, 1997** : Lait et produits laitiers in « abrégé de biochimie alimentaire » Ed. MASSO (4^{ème} édition), pp162-260.
- **Ameen, S.M., Caruso, G. (2017)**. Lactic Acid in the Food Industry, Chemistry of Foods. Springer International Publishing.
- **Ammor S., Taveron G., Dufor E., et Chevalier L., 2006** .Antibacterial activity of lactic aaci bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization et antibacterial compound food controir 17:454-461.
- **Atlan, D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008**. Métabolisme et ingénierie métabolique. In :Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.Paris. 271-447.
- **Axelsson,L.(2004)** .Lactic Acid Bacteria :Classiication and Physiology.In :Salminen,S.Von Wright,A.and Ouwehand A.(Eds),Lactic acid bacteria :microbiological and functional aspects.3rd rev. And exp.ed.Marcel Dekker,Inc.,New York,pp.1-66.
- **Axelsson, L. (2004)**. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (eds), Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker, Inc. 633: 1-66.

B

- **Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*,21: 343–349.
- **BOUMEDIENE Karima,** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, mémoire de magister, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, 2013 , p 16- 17.
- **Bekhouche Farida. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies .
- **Bergy's manual. (2009) .** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer.
- **Braegger C., (2002).** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite .
- **Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988 -** Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane lait : 1: pp 65-84.
- **Badel, S., Bernardi, T. et Michaud, P. 2011.** New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 29(1): 54-66.
- **Bourgeois. C. M, et Larpent. J. P. 1996 : La fermentation alimentaire. Tome 2. Ed .Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp 4-202**

- **Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M. (2004).** Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*,21: 343–349
- **Belkheir, K., Centeno, J.A., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E. et Carballo, J. (2016).** Potential technological interest of indigenous lactic acid bacteria from algerian camel milk. *Ital. J. Food Sci.*, 28: 598-610.1
- **Boublenza, F., Baghdad Belhadj F, Z., Zadi Karam, H., Karam, N, E. (2018).** The effects of thermal, osmotic and acid stress on *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Biosci.* 12 (1):51-64.
- **Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Diviès C. and Garmyn D., 2001.** Métabolisme sucre-Citrate chez *Leuconostoc mesenteroïdes*, laboratoire de Microbiologie UMR- INRA. France. P76.

 C

- **Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V. et Reinheimer J., 2010.** Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In: *Biotechnology of lactic acid bacteria : Novel Applications* (Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M.). 177-192
- **Chamba F.J., 2008.** Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 787-813. _Cholet O, (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIÉS. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16
- **Chandan, R. C., Kilara, A., Shah, N. P. (2008).** Dairy processing and quality assurance. John Wiley & Sons, Inc., USA.

- **Cecchinato a, penasa m, cipolat gotet c, de marchi m, bittante g., 2012** : Short communication: Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. *J. Dairy Sci.*; 95:1709-1713.
- **Champagne C.P., Gardner N.J., Soullignac L. and Innocent J.P., 2000.** The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 124-131.
- **Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale ABIES.UMR de Génie microbiologie des procédés alimentaires. INRA, Institut National Agronomique Paris-Grignon, p16.
- **Coulibaly I., 2010.** Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques. Dissertation originale. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques et ingénierie biologie, Faculté Agro-Bio Tech. Université d Liège - Gembloux. P49
- **Corrieu, G. & Luquet, F. M. (2008)** Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Doc p. 849.
- **Corrieu G. and Luquet F. M., 2008.** Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Editions TEC & DOC, Lavoisier, P271-415 ; 441-442.

 D

- **Dahou .A, Homrani .A, Bensaleh .F et Medjahed .M.(2015).** La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien « type j'ben » : connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique Science 11(6) (2015) 1 - 13* 1 ISSN 1813-548X, <http://www.afriquescience.info>
- **Dahou .A, Bekada .A, Homrani. A, Latreche. B and Ait Saada. D. (2017).** Effect of processing technology on the biodiversity of the bacterial flora of an industrial cheese camembert soft type. **ADVANCES IN BIORESEARCH. Vol. 8 [6] 2017.** Online ISSN 2277-1573 Print ISSN 0976-4585.

- **Dahou .A, Bekada. A et Homrani. A.** (2021).Identification of a *Lactococcus lactis* isolated from a fresh local cheese of the western Algerian steppe « J'ben of Naama ». Journal : Asian Journal of Dairy and Food Research / [https://arccjournals.com/online First Articles](https://arccjournals.com/online-First-Articles). Vol 40, Issue 1 : 40-44,March 2021
- **Daniel Goy, Ernst Jakob, John Haldemann,** Les fermentations lactiques ,groupes de discussion , Agroscope Transfer | N° 59 / Mars 2015 , p 6
- **Desmaures, 1995.** Etude des laits de haute qualité: caractéristiques et aptitudes microbiologiques à la transformation en camembert au lait cru.Thèse, Université de Caen.
- **Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. Cahiers Agricultures, 5, pp: 331-343.
- **De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (2009).** Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.
- **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (2006).** The prokaryotes "third edition": A handbook on the Biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer, Singapore.
- **Desmazaud,M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.
- **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. et De Roissard H.1992.** Métabolisme général des bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques.Ed. Lorica Uriage. 1, 169-207.
- **Desmazeaud M. 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. LeLait. 63, 286-310.

- **Dalgleish D.G, 2007** : The casein micelle and its reactivity. Lait (87): 385-387
- **Desmazeaud, M. (1996)**. Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. Cahiers Agricultures, 5, pp: 331-343.
- **De Man, JC, Rogosa M, Sharpe, ME (1960)**. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol. 23 (1): 130-135

E

- **Eck et Gillis, 2006**. Le fromage. 3eme edition : Tec et Doc, Lavoisier.Paris. 891p.

F

- **FAO/OMS. 1996, Codex Alimentarius. N°A-6-1978**. Code de principes concernant le lait et les produits laitiers. Rome, 258p.
- **Felis, G. E., Salvetti, E., & Torriani, S. (2015)**. Systematics of Lactic Acid Bacteria. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, 25-31. doi:10.1002/9781118868386.ch2.
- **FIL Référence ISO 707/ F.I.L octobre 2018** Normes définies pour les analyses microbiologiques et chimique des produits laitiers.
- **Fröhlich, J et König, H. (2009)**. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

G

- **Galvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R. (2011)**. Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. 253-390.

- **GARRITY G.M., TIMOTHY G.L., JAMES R.C., SCOTT H.H., EUZEBY J. AND TINDALL B.J. (2007).** Taxonomic Outline of Bacteria and Archeae. Part 9- The Bacteria : phylum “ Firmicutes” : class “ Bacilli”. Release 7.7 march 6.
- **Gonzalez A., Larroy C., Biosca J.A. and Ariño J., 2008.** Use of the TRP1 auxotrophic marker for gene disruption and phenotypic analysis in yeast: a note of warning. FEMS Yeast Res, 8 (1): 2- 5.
- **Guiraud, J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237- 251.
- **Guiraud, J.P. 2003.** Microbiologie Alimentaire. Tec &Doc, Dunod. Paris. 90-292.
- **Ghaly A. E., Kamal M. and Correia L. R. 2005.** Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. Bioresource Technology 96(10): **1143-1152.**

 H

- **Ho, T.N.T., Tuan N., Deschamps A. et Caubet R. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142
- **Hassan, A.N. et Frank J.F. 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- **Holzappel et al., 2001 W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr, 73(suppl): 365S–73S

- **Hadef, S. (2012).** Évaluation des aptitudes technologique et probiotiques des bactéries lactiques locales, Kasdi merbah-ouargla. Magister: 135
- **Hassaine, O. (2008).** Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées du lait camelin du sud Algérien. Thèse de Doctorat. Université d'Oran. Algérie
- **HASSAINE Omar** , caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, Thèse de doctorat , Université d'Oran Es-sénia, 2013, p 6-7,44-47.

—K—

- **Kandler O., 1983** . Carbohydrate metabolism in: lactic acid bacteria. Antonie. Van. Leeuwenhoek: 49: pp 209-224
- **König, H., Fröhlich, J. (2009).** Lactic Acid Bacteria, in: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Berlin, Heidelberg. 3-29.

—L—

- **Larpent, J.P. (1996).** les bactéries lactiques In Bourgeois, C.M., Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentation alimentaire. Tec et Doc Lavoisier.4.
- **Liebefeld, 2002.** Microbiologie des cultures. Unité de recherche « lait, fromage ».
- **Luquet, F M., (1986)** .Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343- 442
- **Leroy, F. et De Vuyst, L. 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. Trends in Food Science & Technology 15: 67–78

- **Lee, D.R., Molskness, T.A., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. (1973).** Carbohydrate metabolism in lactic streptococci: fate of galactose s.
- **Leveau JY, Boiux M et De Roissart HB. (1993).** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 3, 2-40.
- **Larsen raul F. et Anon maria C. 1989-1990.** Interaction of Antibiotics and Water Activity on Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. J. Food Sci. 54:4. p.922-924.

 M

- **Mills, O. E. & T. D. Thomas. (1981).** Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. N. Z. J. Dairy Science. Technology, p16:43–55.
- **Mietton B., 1995 :** La typologie des fromages, Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d'agriculture et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.
- **Makhloufi, K. M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv) Mc Auliffe
- **Mahaut M., Jeantet R., Schuck P. Et Brule G., 2000 :** Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.
- **M. EL ATYQY . *Protéines, peptides et acides aminés* . 23/10/2018.** [consulté le 15/07/2021]. Disponible à l'adresse : <https://www.scientecal.com/cours/prot%C3%A9ines-peptides-et-acides-amin%C3%A9s>.
- **MAHI Mohammed ,** Etude Technologique Des Bactéries Lactiques isolées à Partir Du Lait De Brebis, mémoire de magister, université d'Oran, 2010 , p 47- 48

- **Micheline Rousseau , Christiane Le Gallo.** *Fixation des Leuconostocs sur les moules en gres vernisse.* C.R Jouy en Josas. [consulté le 15/07/2021]. Disponible à l'adresse : https://www.researchgate.net/figure/Figure-I-6-Fixation-des-Leuconostocs-sur-les-moules-en-gres-vernisse_fig4_338454567
- **Molskness, T.A., Lee, D.R., Sandine, W.E. and Ellike, P.R. (1973).** β -phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Journal of Applied Microbiology*, 25, pp: 373-380
- **MATAMOROS, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H.,Leroi, F. (2009).** Selection and evaluation of sea food-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria.*Food Microbiol*, 26(6), 638-644.
- **Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010.** *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.* Blackwell. Publishing. Iowa, USA
- **Mahout. M, 2000 :** *Les produits industriels laitiers.* Ed Tec et Doc, Lavoisier. Paris, pp1-10.
- **Mietton B., 1995 :** *La typologie des fromages,* Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d'agriculture et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.
- **Mietton B., Weber F., Desmazeaud M. & De Roissart H. (1994).** Transformation des produits animaux Transformation du lait en fromage. In *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologique.* Vol 2. De Roissart, H. & Luquet, F. M. (Eds), Loriga, Uriage, 55-133.
- **Mäyrä-Mäkinen A Et Bigret M. (2004).** Industrial use and production of lacticacidbacteria. In : *lacticacidbacteria:microbiology and functional aspects* (salminen s., wrighta.v. Et ouwehand a.). 3e ed., marcel dekker, inc. New york, 73-102.

- **Novel G., (1993).** Les bactéries lactiques in « Microbiologie industrielle » les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. LE VEAU, G. V., BOUIX, M. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.

O

- **Ogier, J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saihi A., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The Leuconostoc genus. Int. J. Food Microbiol. 126 : 286-290.

P

- **Pougheon S. (2001).** Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France. p102
- **Papamanoli, E., Tcanctakis, N., Litopoulou-Tzanctaki, E., Kotzekidou, P., 2003.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Sci. 859-867p.
- **Pilet, M.F., Magras C. et Federigh M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- **Pfeiler E.A. and Klaenhammer T.R., 2007.** The genomics of lactic acid bacteria, Trends in Microbiology, 12: 546-553.
- **Pringsulaka, O., Thonggam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul K., Rangsiruji A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food Control, 23: 547-551.

R

- **Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N.-E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest algérien. Euro J Sci Res. 34(2): 218-227.

S

- **Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.
- **Stiles, M.E. et Holzapfel W.H. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- **Shirai. K, Guerrero. I, Huerta. S, Saucedo. G, Castillo. A, O Gonzalez. R, George M. (2001).** Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp emulsion *Hall Enzyme and Microbial Technology* 446-452p.
- **Soomro, A.H., Masud, T. et Anwaar, K. 2002.** Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health-A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1: 20 24.
- **Schmidt. J. L, Tourneur. C, et Lenoir. J, 1994 :** Fonction et choix des bactéries lactique laitières in « bactéries lactique ».Vol II. Ed. Loriga, paris, pp 37.
- **Somkuti, G.A., and Steinberg, D.H. 1979.** Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose, glucose and galactose. *Journal of Food and Protection*, 11, pp: 885-887.

T

- **Thunell, R. K. (1995).** Symposium: The dairy Leuconostocs. *Journal of Dairy Science*, 78: 25142522
- **Tosukhowong, A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005.** Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci.Bioengin.* 99: 30-37.
- **Teuber Michael, Geis Arnold, 2006.** The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228

- **Thompson, J. (1979).** Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *Journal of Bacteriology*, 140, pp: 774-785.
- **Tessier, L., 2007.** Technologies des procédés industriels, Centre Col. ed. Montréal.
- **Tortora. G..J ; B.R. Funk ; C.L. Case. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.
- **Thieulin et Vuillaume. (1967).**Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait de produits laitiers et des œufs-revue générale des questions laitières 48 avenue, Président Wilson, Paris : 71-73.388p

— V —

- **Vignola Carole L, 2002.** Science et technologie du lait transformation du lait. Ecole Polytechnique de Montréal,2002.
- **Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J.,Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G., et Siezen, R. J. 2002.** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111–121
- **Von Wright, A. et Axelsson, L. 2012.** Lactic acid bacteria: An introduction. In Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A. et Ouwehand, A., *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press:1-17
- **Vignola Carole L, 2002 :** Science et technologie du lait transformation du lait. Ecole Polytechnique de Montréal 2002

W

- Entrée consulté .In **wikipédia**, *Enterococcus faecalis* [en ligne]. [consulté le 15/07/2021]. Disponible à l'adresse : https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis .
- Entrée consulté .In **wikipédia**, *Bifidobacterium longum*[en ligne]. [consulté le 15/07/2021]. Disponible à l'adresse : https://fr.wikipedia.org/wiki/Bifidobacterium_longum.
- Entrée consulté .In **wikipédia**, *point isoélectrique* [en ligne]. [consulté le 15/07/2021]. Disponible à l'adresse : https://fr.wikipedia.org/wiki/Point_iso%C3%A9lectrique

Z

- **Zadi-Karam, H. et Karam, N-E. (2007)**. Cinétique de croissance et d'acidification de souches de Lactobacillus isolées de lait de chamelle. (Growth and acidification kinetics of strains of Lactobacillus isolated from camel milk). 14ème Congrès 3R, 6-17 **Site web :**

<http://biochimej.univangers.fr/Page2/TexteTD/7ModuleS6BG3/ZSuite/5HenderHassel/1HenderHassel.htm>

Annexes

Annexe A : Composition des milieux de culture.

➤ **Milieu MRS (pH 6.5)**

- Peptone	10g
-Extrait de viande.....	10g
-Extrait de levure.....	5g
-Glucose.....	20g
-Tween 80.....	1ml
-Phosphate bipotassique	2g
-Acétate de sodium.....	5g
- Citrate d'ammonium.....	2g
-Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	0.2g
-Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O.....	0.5g
-Agar.....	15g
-Eau distillée qsp.....	1000ml
-Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant	15min

➤ **Milieux solides**

1. Gélose (PCA)

Composition en g/l :

- Tryptone.....	5,0g
- Extrait autolytique de levure.....	2,g
-Glucose.....	1,0g
- Agar-agar bactériologique.....	12,0g
- PH du milieu prêt-à-l' emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.	

Annexe B : Coloration de Gram (Singleton,1999)

- ✓ Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- ✓ Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, 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 Rincer avec l'eau distillée pendant 5 secondes
- ✓ Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- ✓ Laver avec l'eau distillée pendant 10 secondes
- ✓ Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

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

Annexe C : Test de catalase

- ✓ Préparer une lame propre et stérile ;
- ✓ Déposer 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 10 volume sur la lame ;
- ✓ A l'aide d'une pipette stérile prélevé quelques cellules de la colonie ;
- ✓ Mélanger soigneusement les cellules avec de l'eau oxygénée.

Lecture : dégagement de gaz signifie que la souche est catalase +, l'absence de dégagement de gaz signifie que la souche est catalase négative (LEVEAU et al., 1991 ; DELARAS, 2007).