

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../S

Mémoire de fin d'études

Présenté par

MECHEHOUD Mansouria

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Exploitation des Ecosystèmes microbiens laitiers

Thème

**Valorisation des souches lactiques thermophiles
dans la fabrication d'un fromage à pâte molle de
type stabilisée.**

Soutenue publiquement le **21 / 06 / 2017**

Devant le Jury

Présidente	Mme BELKACEMI	Université Mostaganem
Encadreur	Mr NEMMICHE Said	Université Mostaganem
Examinatrice	Mme RACHIDI SIDHOM N	Université Mostaganem
Co-encadreur	Mr DAHOU A	Université Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire des sciences et techniques de production animale Hassi-Mamèche
Mostaganem.*

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Un grand merci à **M. DAHOU** Abdelkader El-amine. Spécialiste en transformation fromagère, qui m'a guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et m'a bien expliqué les étapes de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements pour son aide et son soutien.*

*Je tiens avant tout à remercier mon promoteur **Dr. NEMMACHE** Said qui a accepté de m'encadrer*

Je tiens également à remercier :

***M. BELKACEM** L pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.*

***M. RACHID** SIDHOM N. pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Je remercie ma famille pour leurs aides durant mes études et leurs soutiens.

Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes gratitude et respects

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes chères parents, qui m'ont beaucoup soutenu et
encouragé jusqu'au bout*

*Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que
DIEU vous protège et vous donne bonne santé*

Mes chers frères : Lakhdar , Abibe

*Mes très chères sœurs : Khadija, Aïcha, Khadoma,
Fatima Zahra.*

A toute ma grande famille.

*A mes très chères amies : Nourelhouda, Sarah, Ahlam,
Zaïneb, Souhila.*

A toutes mes collègues.

Résumé

Les produits laitiers sont considérés comme une bonne source des bactéries lactiques. En plus de l'importance de la composition physico-chimique et de la haute valeur nutritionnelle du fromage, la caractéristique physico-chimique reste un élément majeur de la qualité de fromage à pâte molle. La production de fromage passe par quatre étapes : la coagulation du lait, l'égouttage du caillé, le salage et l'affinage. Cette dernière étape est reconnue comme la période cruciale dans le développement des propriétés organoleptiques typiques des fromages. L'une sert à la fabrication des fromages et l'autre à leur affinage. Elles permettent de préparer et d'affiner les fromages dans des conditions d'ambiance et d'asepsie contrôlées. Elles sont maintenues en légère surpression afin d'éviter l'entrée de contaminants extérieurs.

L'application des ferments reconstitués dans la fabrication des fromages à pâte molle a révélé une meilleure qualité hygiénique qui répond aux normes nationales et internationales.

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques des cultures pures et des ferments reconstitués montrent une bonne capacité d'acidification, certaines ont montré une bonne activité protéolytique

Mots clés : Bactéries lactiques, fromage à pâte molle, technologie de fabrication, *Streptococcus thermophilus*, aptitudes technologiques.

Abstract

Dairy products are considered a good source of lactic acid bacteria.

In addition to the importance of physicochemical composition and the high nutritional value of cheese, the physico-chemical characteristic remains a major factor in the quality of soft cheese. The production of cheese passes through four stages: the coagulation of milk, the draining of the curd, the salting and refining. This last step is recognized as the crucial period in the development of the typical organoleptic properties of cheeses. One is used for the manufacture of cheeses and the other for ripening. They allow the preparation and refining of cheeses under controlled environmental conditions and asepsis. They are maintained in a slight overpressure in order to avoid the entry of external contaminants.

The application of reconstituted ferments in the manufacture of soft sour dough cheeses revealed a better hygienic quality that meets national and international standards.

The results of the evaluation of the technological capacities of the pure cultures and of the reconstituted ferments show a good capacity of acidification, some showed good proteolytic activity.

Key words: Lactic acid bacteria, soft cheese, manufacturing technology, *Streptococcus thermophilus*, technological aptitudes.

ملخص

وتعتبر منتجات الألبان مصدرا جيدا للبكتيريا حمض اللاكتيك بالإضافة إلى أهمية تكوين الفيزيائي والكيميائي والقيمة الغذائية العالية من الجبن، وتبقى سمة الفيزيائية عنصرا أساسيا في نوعية الجبن الطري. ويشمل إنتاج الجبن أربع خطوات: الحليب التخثر، تجفيف اللبن الرائب، والتعليق والتكرير. ومن المسلم به هذه الخطوة الأخيرة على اعتبار أن المرحلة الحاسمة في تطور الخصائص الحسية نموذجية من الجبن. واحد وتستخدم لجعل الجبن وغيرها في التكرير الخاصة بهم. أنها تساعد على إعداد وصقل الجبن في ظل ظروف الغلاف الجوي للرقابة والعقيم. يتم الاحتفاظ بها في الضغط الزائد طفيف وذلك لتجنب دخول الملوثات الخارجية أظهر تطبيق الانزيمات تشكيلها في إنتاج الجبن العجين الحامض لينة جودة صحية أفضل يلبي المعايير الوطنية والدولية نتائج تقييم القدرات التكنولوجية ثقافات نقية والانزيمات أعيد تظهر قدرة جيدة على تحمض، وأظهرت بعض النشاط بروتين جيد.

كلمات البحث: البكتيريا اللبنية، الجبن الطري، تكنولوجيا التصنيع *Streptococcus thermophilus* ,

المهارات التكنولوجية

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

I-Généralités sur les bactéries lactiques.....	02
I.1. Présentation des bactéries lactiques.....	02
I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	02
I.3. Génétique des bactéries lactiques	03
I.4.Taxonomie des bactéries lactiques.....	04
I.5.Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	06
I.5.1. Le genre Streptococcus.....	06
I.5.2. Le genre Lactobacillus.....	06
I.5.3. Le genre Lactococcus	07
I.5.4. Le genre Enterococcus.....	07
I.5.5. Les genres Leuconostoc.....	08
I.5.6. Les genres Pediococcus Tetragenococcus.....	08
I.5.7. Le genre Bifidobacterium.....	09
I.5.8.Le genre Vagococcus.....	09
I.6.Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	09
I.6.1. Voie homofermentaire ou EMP.....	10
I.6.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	10
I.7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	11
I.7.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques.....	11
I.7.2.Métabolisme de l'oxygène.....	11
I.8.Intérêt des bactéries lactiques.....	12
I.9.Les ferments lactiques.....	12
I.9.1. Définition des ferments lactiques.....	12
I.9.2. Types de ferments lactiques.....	12
11 I.9.2.1. Selon la composition	13
I.9.2.2. Selon la température de croissance	13
I. 10. Critères de sélection des ferments lactiques.....	14
I. 10.1. Critères de sécurité.....	14
I. 10.2. Aptitudes technologiques.....	14
I. 10.2.1. Aptitude acidifiante.....	14
I. 10.2.2. Aptitude protéolytique.....	15
I.10.2.3. Aptitude lipolytique.....	15
I.10.2.4. Aptitude aromatisant.....	16
I.10.2.5. Aptitude texturant.....	16

Chapitre II: Application des bactéries lactiques en technologie fromagère

II.1. Généralités sur les fromages.....	17
II.2. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie.....	17
II.3. Rôles et propriétés attendues des bactéries lactiques en fromagerie.....	18
II.4.les bactéries lactiques acidifiantes thermophiles.....	20
II.5.Rôle et propriétés des streptocoques lactiques dans fabrication des fromages de types pâte molle stabilisée.....	20
II.6.le procédé de fabrication fromagère pâte molle de type stabilisée.....	21
II.7. Qualité des fromages.....	22
II.7.1. Qualité hygiénique.....	22
II.7.2. Qualité nutritionnelle.....	22
II.7.3. Qualité sensorielle.....	22
II.8.Rendement fromager.....	22

II.Etude Expérimentale: Matériel ET Méthodes

II.1.Lieu d'étude.....	23
II.2.Matériel.....	23
II.3.Méthodes.....	24
II.1.Revivification des souches lactiques.....	24
II.2. Ensemencement du lait.....	24
II.2.1.Préparation milieu Agar au lait.....	24
II.2.2.préparation les dilutions.....	25
II.2.3.Contrôle de la pureté de la souche bactérienne.....	25
II.2.Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées.....	25
II.2.1.Pouvoir acidifiant.....	25
II.2.2.Pouvoir coagulant.....	26
II.2.3.Pouvoir protéolytique.....	26
II.2.4.Pouvoir épaississant.....	27
II.2.5.Pouvoir aromatisant.....	27
II.3.Tests physiologiques et biochimiques.....	27
II.3.1.Recherche de la catalase.....	27
II.3.2.Recherche de type fermentaire.....	28
II.3.3.culture sur lait de Sherman.....	28
II.3.4.Conservation de la souche St.....	29
II.4.Fabrication d'un fromage à pate molle de type stabilisée.....	29
II.4.1.Technologie de fabrication.....	29
II.4.2.Préparation de la saumure.....	30
II.4.3.Préparation du lait et des ferments.....	30
II.4.4.Maturation.....	30
II.4.5. Moulage PH du caillé = 6.10.....	31
II.4.6.Egouttage.....	32
II.4.7.Le démoulage du fromage.....	33
II.4.8.le salage.....	34
II.4.9-ressuyage.....	34

II .4.10.Affinage.....	35
II .5.Contrôle microbiologique.....	36
II .6.Analyse sensorielle.....	37

III. Résultats ET Discussion

III.1-Etude morphologique.....	38
a.Critères macroscopiques.....	38
b. Critères microscopiques.....	39
III.2.Caractères physiologiques et biochimiques.....	39
III.2.1.Culture sur lait de Sherman.....	39
III.2.2. Recherche de type fermentaire.....	39
III.3. Aptitudes technologiques des isolats de bactéries lactiques.....	40
III.3.1. Pouvoir acidifiant.....	40
III.3.2.Pouvoir coagulant.....	40
III.3.3. Pouvoir épaississant.....	41
III.3.4.Pouvoir aromatisant.....	41
III.3.5. Aptitude protéolytique.....	42
III.4.Fabrication du fromage à pâte molle stabilisée et évaluation de sa qualité.....	42
III.4.1.Le produit fini et le rendement fromager.....	43
III.4.2.Qualité microbiologique des fromages à pate molle fabriqués.....	44
III.4.3.Qualité hygiénique.....	44
III.4.4.Qualité sensorielle.....	45
Discision.....	46

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

G+C: Guanine + Cytosine

EMP: Embden Meyerhof-Parnas

Strp: Streptococcus thermophilus

EMP: d'Embden-Meyerhof Parnas

BL: bactéries lactiques

PrtP: protéase de paroi

ml: millilitre.

pH: potential d'hydrogène.

H : heure.

T: temps.

D°: Degré dornic.

C°: Degree Celsius.

EPS: synthétiser des exopolysaccharides.

BPH: bonnes pratiques d'hygiène.

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.....	05
Figure02 : Diagramme de fabrication de fromage à pate molle de type stabilisée.....	21
Figure 03 : Recherche de type fermentaire sur le milieu Gibson-Abdelmalek.....	28
Figure 04 : culture sur lait de sherman La souche a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène.....	29
Figure 05 : l'hygiène de la salle (à T= 20 à 22 °C).....	29
Figure 06 : Chauffé 07 litres de lait : à T = 40 °C.....	30
Figure 07 : La coagulation du lait : Après 2 heures 30 minutes.....	31
Figure 08 : La séparation lactosérum 40 %.....	31
Figure 09 : Le moulage et le retournement pour accomplir l'égouttage.....	31
Figure 10 : Le démoulage du fromage.....	33
Figure 11 : L'affinage du fromage dans l'étuve d'affinage.....	35
Figure 12 : Aspect de culture pure <i>Streptococcus</i> , en milieu M17 liquide.....	38
Figure 13 : Aspect des colonies de <i>Streptococcus</i> obtenues après 24 h d'incubation à 30 °C sur milieu PCA Lait.	38
Figure 14 : Photo d'Observation Microscopique d'une Streptococcus : des Coques.....	39
Figure 15 : Test de Sherman Les Streptocoques thermophiles sont très sensibles au colorant.....	39
Figure 16 : Aspect du gel formé par le ferment.....	41
Figure 17 : le gel formé sur lait saccharose épaississant filante.....	41
Figure 18 : Activité protéolytique chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	42
Figure 19 : deux pièces de fromage à pate molle fabriqué.....	43
Figure 20 : la croissance les <i>Streptococcus thermophilus</i> au cours de l'affinage.....	44
Figure 21 : Résultat positif aucune croissance des bactéries pathogènes.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie.....	19
Tableau 02 : Pour la réalisation des différentes parties expérimentales.....	23
Tableau 03 : Transformation 07 litres de lait UHT entier	30
Tableau 04 : Résultat La mesure de l'activité acidifiante et pH des différents temps.....	40
Tableau 05 : Le rendement fromager.....	43
Tableau 06 : Résultats du test de dégustation après 07 jours d'affinages.....	45

Introduction

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Elles sont largement impliquées dans la fabrication de produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés et leur confère une saveur typique (Labaoui *et al.*, 2005). Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exo-polysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzi *et al.*, 2010).

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

L'objectif principal de cette étude est d'essayer la fabrication d'un fromage à pâte molle de type stabilisée de qualité en utilisant des bactéries *Streptococcus thermophilus* lactiques isolées et identifiées.

De manière spécifique, il s'agit de:

- fabriquer du fromage à pâte molle de type stabilisée,
- déterminer les propriétés physico-chimiques du lait et du fromage;
- déterminer les propriétés microbiologiques du fromage à pâte molle.

Chapitre I : Bactéries Lactiques

I. Généralités sur les bactéries lactiques

I.1. Présentation des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Stackebrand et Goebel 1994). Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et bacilles (LABIOUI et *al.*, 2005), dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Rouisset et Bensoltane, 2006).

Ces bactéries lactiques encore appelées bactéries de l'acide lactique sont caractérisées par leur aptitude à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (D(-), L(+) ou DL) tout en utilisant les voies cataboliques d'Embden Meyerhof-Parnas (EMP), de Dickens-Horecker et d'Etner Doudoroff (Savadogo et Traore., 2011).

La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et *al.*, 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles 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 ; Hogg, 2005). Leur ADN présente un pourcentage de G+C compris entre 30 et 60% (Stiles et Holzafel, 1997).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animal (Dortu et *al.*, 2009 ; Mayo et *al.*, 2010 in Zarour et *al.*, 2012). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus Lactis Subsp. Lactis* a été 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 (Axelsson, 2004).

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, l'espèce *Streptococcus thermophilus*, qui est isolé du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et des levains artisanaux (Delorme, 2008). Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes, des végétaux en fermentation, des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Dellaglio et al. 1994). Par ailleurs les espèces du genre *Pediococcus* sont présents surtout dans les végétaux en décomposition, le lait, les différents fromages.

Tandis que, 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*) (Bernardeau et al., 2008).

I.3.Génétique des bactéries lactiques :

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures: le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques. Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant perdu certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques. Ainsi, la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait.

D'autres caractères technologiques sont également codés par des gènes portés par des plasmides la capacité à utiliser le lactose, le métabolisme de précurseurs d'arômes, la production de la nisine chez certaines souches, des résistances aux bactériophages (Stackebrandt et Teuber., 1988 et Kandler et Weiss., 1986).

I.4. Taxonomie des bactéries lactiques :

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

Dès 1974, selon le *Bergey's manual* (Holt et al., 1994), les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcacea* et celle des *Lactobacillacea*. En 1985, Schleifer et al. ont proposé la division des *streptocoques* en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les *Streptocoques* lactiques (Dellaglio et al., 1994).

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

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

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008).

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

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 01) (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pilet et *al.*, 2005).

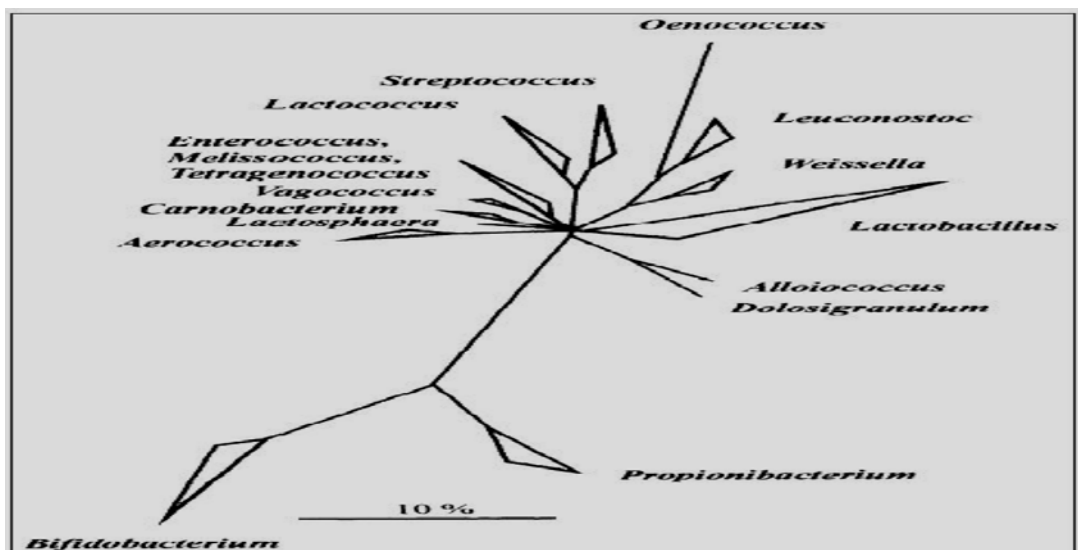


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

I.5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques :

I.5.1. Le genre *Streptococcus* :

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme : *S.pyogenes* et *S.agalactiae*. (Laurent et al., 1998 ; Sun et al,2014).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

I.5.2. Le genre *Lactobacillus* :

Le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae* sont *Lactobacillus*. il range de multiples espèces qui sont des agents de fermentation lactique interviennent dans de nombreuses industrie alimentaire, ont des aspects varies allant des bacilles long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court. Souvent groupes en chaines, se développent a une température optimum situe entre 30 et 40c, Gram positive, non sporules, immobile, catalase négative, résistent au stress acides que les lactocoques. (Siegumfeldt et al., 2000 ; Khalid et Marth., 1990 ; Leclere et al., 1994 Sun et al, 2014). Le genre Lactobacilles est habituellement sensible à des nombreux inhibiteurs de synthèse de la paroi cellulaire, comme les pénicillines et l'ampicilline (babato 2014)

Les Lactobacilles a été subdivise par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guirand et Rosec, 2004) :

- Groupe I: <*Thermobacterium*>, regroupe les *Lactobacilles* homofermentaire thermophile (homofermentaire obligatoire). C'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose à 45c mais pas à 15c. la plupart des espèces

présente dans le lait et les produit lactière (*Lb.Helveticus*, *Lb.Delbruechu* , *Lb.acidophilus*).(Laurent et al.,1998. Zhang et Cai.2014).

- Groupe II: <*Streptobacterium*>, forme les Lactobacilles heterofermentaire mesophiles.il est constitue d'une vingtaine d'espèces dont : *Lb.casei*, *Lb.curvatus* ,*Lb.Sake* et *Lb.Plantarum*. (Laurent et al., 1998. Zhang et Cai.2014).
- Groupe III: <*Betabacterium*>, ce sont des *Lactobacilles* heterofermentaire. Il comporte les espèces *Lb.fermentum*, *Lb.brevis* et *Lb.Sanfransisco*. Relativement hétérogènes, mésophiles, elle présent dans les produits lactières et carnes certains espèces ce développent dans le tube digestif de l'homme et participent a l'équilibre de la flore intestinale. (Laurent et al., 1998. Zhang et Cai.2014).

I.5.3. Le genre *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* (*streptocoque* du groupe N) représente les *streptocoques* dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

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

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris* et *Lc. lactis ssp. hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).

I.5.4. Le genre *Enterococcus* :

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires,

généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10 °C et 45 °C (Tamime, 2002 ; Ho et *al.*, 2007).

I.5.5. Les genres *Leuconostoc* :

Oenococcus et *Weissella* Ils ressemblent 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 dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et *al.*, 1998 ; 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 *leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* et *Ln. 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, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997). Le rôle des *Leuconostocs* dans la formation de l'arôme et la texture des fromages est important (Hemme et Foucaud-Scheunmann, 2004). Les souches de *L. mesenteroides* et *L.lactis* métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la saveur des fromages comme le diacétyle et l'acétoïne (Vedamuthu, 1994). Ainsi, certaines de ces souches sont introduites dans des levains lactiques en association avec des *lactocoques* car leur capacité acidifiante est limitée.

I.5.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable 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 and Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

I.5.7. Le genre *Bifidobacterium* :

Ce genre 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 à 43 °C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

I.5.8. Le genre *Vagococcus* :

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (Teixeira et al., 1999). Les amorces d'oligo-nucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (Ammor et al., 2006).

I.6. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des

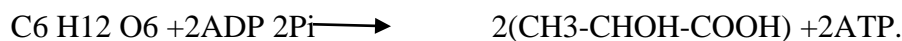
pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et *al.*, 2008) :

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

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

I.6.1. Voie homofermentaire ou EMP :(d'Embden-Meyerhof Parnas)

Toutes les LAB à l'exception des genres : *leuconostoc oenococcus* , *weissella* , certaines espèces du genre *lactobacilles* qui emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glucose-6-P jusqu'au pyruvate) ; Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule du glucose consommée (Mozzi, 2010 ; Drider et Prevost, 2009).



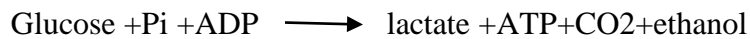
la fructose 1-6-biphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Mozzi et al, 2010 ; Thomson et Gentry-Weeks., 1994). Le métabolisme EMP est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate. (Drider et Prevost, 2009).

Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose ces bactéries produisent également, en plus l'acide acétique l'acide formique et l'éthanol et CO₂ (Drider et Prevost, 2009).

I.6.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. 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 (Thompson et GentryWeeks, 1994).



I.7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :

I.7.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques

De fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des bactéries lactiques repose sur leur système protéolytique. Ces systèmes comportent des protéases intracellulaires, des systèmes de transport spécifiques pour les peptides et une multitude de peptidases intracellulaires. Les systèmes protéiques des *lactocoques* et des lactobacilles sont remarquablement similaires, en ce qui concerne leurs composants et leurs modes d'action (Law et Haandrikman, 1997 ; Savijoki et *al.*, 2006).

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus* et ont permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse:

- il fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne.
- Des di et tripeptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques.
- Enfin, dans le cytoplasme bactérien un éventail de peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (Savijoki et *al.*, 2006 ; Atlan et *al.*, 2008; Picon et *al.*, 2010).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Williams et *al.*, 2001).

I.7.2-Métabolisme de l'oxygène

Les bactéries lactiques sont en général aérotolérantes, même en présence d'O₂. Elles sont incapables de réaliser des phosphorylations oxydatives. Généralement, les chaînes transportant les électrons ne fonctionnent pas, mais des étapes d'oxydo-réduction du NAD

interviennent. Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou une molécule d'eau grâce à des NADH : H_2O_2 ou NADH : H_2O oxydases (Bourgeois et *al.* 1996 ; Desmazeaud, 1996).

I.8.Intérêt des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (Belyagoubi, 2014).

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (Makhloufi, 2011).

I.9.Les ferments lactiques

I.9.1.Définition des ferments lactiques

Un ferment est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules, d'un seul microorganisme ou plus, ajoutée à une matière première pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation. Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle important dans ces processus et une longue histoire d'application. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés comme les yaourts, le kéfir et les fromages (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004) .

I.9.2. Types de ferments lactiques

Les ferments lactiques peuvent être classés en se basant sur leur fonction, leur température de croissance, ou leur composition (Carminati et *al.*, 2010).

I.9.2.1. Selon la composition

Selon la fédération internationale de laiterie (1997), les ferments lactiques peuvent être classés en trois catégories (Wouters et *al.*, 2002 ; Monnet et *al.*, 2008) :

- **Les ferments purs** : constitués d'une souche d'une seule espèce bien caractérisée, c'est-à-dire une culture provenant en principe d'une seule cellule bactérienne.
- **Les ferments mixtes** : ils sont formés d'un mélange de souches en nombre et en proportions indéfinis, ces souches appartiennent aux différents types lyso-typiques et ont donc, en général, une bonne activité acidifiante.
- **Les ferments mixtes sélectionnés** : Contiennent plusieurs souches bien définies, issues d'une ou de plusieurs espèces et les proportions entre les souches sont connues et définies selon le cahier des charges de l'utilisateur.

I.9.2.2. Selon la température de croissance

Les ferments lactiques sont, selon les productions industrielles à réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles :

- 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. 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*). 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 (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Carminati et *al.*, 2010).

I. 10. Critères de sélection des ferments lactiques

La sélection des ferments lactiques s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois aux spécifications demandées par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur. Ces critères relèvent éventuellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leur performance et de leur sécurité. Ils diffèrent selon le type de produit désiré, les caractéristiques des matières premières à transformer et la technologie appliquée (Béal et al., 2008).

I. 10. 1. Critères de sécurité :

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer de substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) à l'exception de certains entérocoques (Ammor et al., 2006 ; Monnet et al., 2008).

I. 10. 2. Aptitudes technologiques

I. 10. 2. 1. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (MäyräMäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (Béal et al., 2008) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet et *al.*, 2008). Afin de réaliser une caractérisation technologique des souches, il est utile de mesurer l'activité acidifiante des bactéries en reproduisant l'évolution thermique du fromage (Chamba and Prost, 1989). Pour mesurer l'activité acidifiante des bactéries dans le lait, la destruction préalable de la flore contaminante est nécessaire (CHAVARRI et *al.*, 1983).

L. lactis subsp. lactis, *ssp. cremoris* et *biovar. diacetylactis* sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (Casalta et *al.*, 1995 ; Lafarge et *al.*, 2004).

I. 10. 2. 2. Aptitude protéolytique

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law and Haandrikman, 1997). La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines.

Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor et *al.*, 2007 ; Monnet et *al.*, 2008 ; Roudj et *al.*, 2009).

I. 10. 2. 3. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et *al.*, 2008).

D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue

(>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et *al.*, 2008 ; Serhan et *al.*, 2009).

I. 10. 2. 4. Aptitude aromatisant

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

I. 10. 2. 5. Aptitude texturant

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exo-polysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis.

Chapitre II : Application des bactéries lactiques en technologie fromagère

II .1. Généralités sur les fromages:

Les fromages sont des formes de conservation et de report ancestrales de la matière utile du lait (protéines, matière grasse ainsi qu'une partie du calcium et phosphore), dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (Jeantet et *al.*, 2008).

La dénomination « fromage » est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse (directive n°88-1206 décembre 1988, article 1er) (Mahaut et *al.*, 2000).

La diversité des procédés fromagers (types de lait, de coagulation, d'égouttage, cuisson, flore et type d'affinage) permet d'obtenir des produits présentant des caractéristiques texturales et gustatives très différentes. Il existe huit grandes familles de fromages : pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée, pâte dure, pâte filée, les fromages de lactosérum et, enfin, les fromages salés conservés en saumure (St-Gelais et *al.*, 2002). Dans cet écosystème, les bactéries lactiques jouent un rôle primordial, non seulement parce qu'elles interviennent dès les premières étapes de fabrication des fromages, mais aussi parce que leur action est déterminante sur les autres microorganismes et le fonctionnement du bioréacteur fromage (Chamba, 2008).

II .2. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie :

Elles appartiennent principalement à trois genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* qui se différencient, entre autre, par leur activité acidifiante. Les lactobacilles utilisés pour leur activité acidifiante sont thermophiles et appartiennent au groupe I : *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii ssp. lactis* et *Lb. helveticus* ; se développant assez difficilement au pH initial du lait, les lactobacilles thermophiles ne sont jamais utilisés seuls en fromagerie (Hassan and Frank, 2001 ; Chamba, 2008).

II .3. Rôles et propriétés attendues des bactéries lactiques en fromagerie

En fromagerie, l'objectif principal est d'atteindre les valeurs cibles en termes d'extrait sec ; la gestion de l'égouttage est étroitement liée à l'acidification du produit au cours de sa fabrication. L'impact fermentaire sur la qualité des produits est donc très important. Les fournisseurs de ferments industriels proposent aujourd'hui des associations de ferments très spécifiques de façon à avoir la cinétique d'acidification souhaitée (Branger *et al.*, 2007).

Lactococcus lactis est la seule lactocoque utilisée industriellement en fromagerie. Les deux sous espèces *Lc. lactis ssp. lactis* et *Lc. lactis ssp. cremoris* se distinguent essentiellement par leur capacité acidifiante et leur sensibilité à la température. Le biovar *Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* utilise le citrate, produit du diacétyl, de l'acétoïne et du CO₂. Les lactocoques sont utilisés dans la majorité des technologies fromagères où ils peuvent constituer le seul ensemencement en bactéries lactiques. *Streptococcus thermophilus* est le seul streptocoque habituellement utilisé en fromagerie mais, toujours en association avec d'autres espèces. Il y'a quelques années, une nouvelle espèce *St. macedonicus* a été mise en évidence (Chamba, 2008).

D'emploi moins fréquent, les leuconostocs sont essentiellement utilisés pour leur production de composés aromatiques et de CO₂ utile pour assurer l'ouverture de certains fromages. Les lactobacilles hétéro-fermentaires facultatifs (groupe II) commencent à être utilisées comme ferment de fromagerie dont les principales espèces utilisables sont *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* et *Lb. rhamnosus*. Par ailleurs, certaines souches parmi ces espèces sont utilisées pour leurs propriétés probiotiques (Gardinier *et al.*, 1998 ; Chamba, 2008).

Tableau 01 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie (Branger et al., 2007) :

Propriétés des ferments lactiques	Effets sur le produit
Transformer les sucres en acide lactique	Abaissement du pH - conservation des produits - limitation du développement de bactéries nuisibles - modification de la micelle de caséine Solubilisation des minéraux liés à la caséine - action sur l'égouttage des caillés (teneur en eau) - action sur la texture des fromages Diminution de la concentration en lactose - production de lactate (action sur la flaveur des fromages)
Transformer les sucres en CO ₂	Libération de CO ₂ - ouverture utile en pâtes molles et pâtes persillées - ouverture nuisible en pâtes pressées
Transformer les citrates	Formation de diacétyle - recherché en fromages à pâte fraîche et molles
Transformer la caséine	Protéolyse pendant la maturation - activation de la croissance (peptides, acides aminés) Protéolyse pendant l'affinage - modification de la texture, couleur, flaveur
Produire des polysaccharides	Epaissement du milieu pour les pâtes fraîches - augmentation de la viscosité par libération de polysaccharide pendant la fermentation lactique

II .4.les bactéries lactiques acidifiantes thermophiles :

Le processus d'acidification associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés, limitation des risques de développement de flores pathogènes et de flores d'altération dans les produits finis.

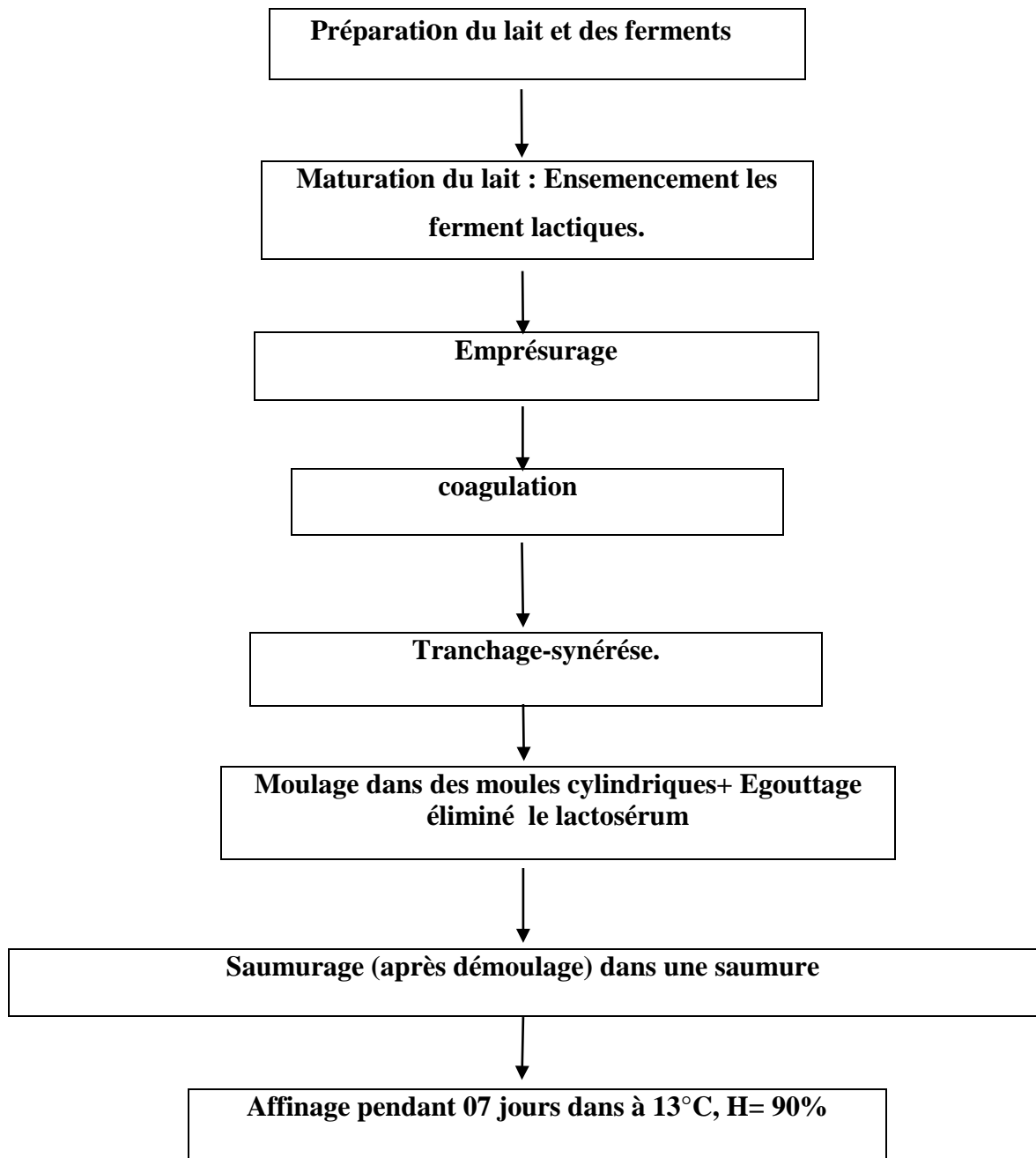
L'acide lactique est le principal métabolite produit au cours de la croissance des bactéries lactiques thermophiles. Ils sont importants de limiter la durée des phases de latence suivant l'ensemencement des ferments lactiques.

II .5.Rôle et propriétés des streptocoques lactiques dans fabrication des fromages de types pâte molle stabilisée.

Les streptocoques sont des coques à coloration de Gram positive et catalase négative qui possèdent un métabolisme homofermentaire strict, conduisant essentiellement à la production d'acide lactique. Le genre *Streptococcus thermophilus* regroupe à la fois des bactéries d'intérêt industriel et nutritionnel.

C'est actuellement le seul streptocoque utilisé volontairement dans la fabrication des fromages et les produits laitiers. En effet, cette espèce présente le grand avantage de produire une activité acidifiante dans un large spectre de température, sa température optimale de croissance se situe entre 42 et 44 °C.

Les Propriétés des streptocoques lactiques d'intérêt pour la fabrication des fromages de types pâte molle stabilisée, ce sont liées à l'acidification, le second rôle important concerne à la des activités protéolytique qui constitue une étape de l'affinage, en agissant aussi bien sur la texture que sur l'arome de la produit fini (Beal,louvet 1986), enfin le rôle essentiellement les Propriétés inhibitrices contre les pathogènes alimentaires et d'activation entre micro-organismes.

II.6.le procédé de fabrication fromagère pâte molle de type stabilisée :**Figure02** : Diagramme de fabrication de fromage à pate molle de type stabilisée.

II .7. Qualité des fromages

La qualité des fromages dépend d'un grand nombre de facteurs, liés à la fois à la technologie de fabrication et aux caractéristiques chimiques et microbiologiques de la matière première mise en œuvre (Coulon et *al.*, 2005 ; Awad et *al.*, 2007). Les composantes de la qualité sont multiples :

II .7.1. Qualité hygiénique : les matières premières et les aliments qui en sont issus doivent être dépourvus de microorganismes pathogènes, de toxines, de résidus chimiques ou de composants indésirables générés par les procédés.

II .7.2. Qualité nutritionnelle : la concentration relative et la nature des différents nutriments ne doivent si possible pas être trop éloignées des recommandations des nutritionnistes.

II .7.3. Qualité sensorielle : les qualités organoleptiques conditionnent l'appétence et le plaisir que procure la consommation du produit, elles intègrent la couleur, la texture, l'odeur, la saveur et l'arôme.

Ces différentes composantes qualitatives peuvent être appréhendées et évaluées par des méthodes biologiques (analyse microbiologique), physicochimiques (texture, composition) et par des méthodes sensorielles (saveur-arôme) (Jeantet et *al.*, 2007).

II.8.Rendement fromager

Le Rendement fromager est une des données les plus importantes pour une fromagerie. En effet, la quantité de fromage généralement obtenue est faible par rapport à la quantité d'ingrédients mis en œuvre. Le rendement est évalué en établissant le rapport entre la quantité de fromage obtenue et la quantité de lait utilisée. Il est possible d'établir des rendements basés sur la récupération des composants laitiers, les protéines et la matière grasse. L'humidité finale du produit est le facteur principal du rendement fromager (égouttage), ainsi que la durée d'entreposage du lait (St-Gelais et *al.*, 2002).

II. 1.Lieu d'étude :

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche des sciences et techniques de production animale (LSTPA) Hassi-Mamèche, Mostaganem, durant la période Mars –Mai 2017.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Etude des aptitudes technologiques de ces bactéries lactiques isolées.
- Application des ferments sélectionnés dans la fabrication d'un fromage à pâte molle (camembert de type stabilisé) au sein du laboratoire.

II .2 .Matériel

Tableau 02 : représentation des différentes parties expérimentales :

1-Matériel biologique :	-Bactérie lactique (Streptococcus lactique) -lait écrémé (Silhouette) -Le ferment industriel et la présure -Disques d'antibiotiques
2-Milieus de culture :	- Milieu M17 - Milieu MRS (de Man-Rogosa et Sharp -Le bouillon : MRS -Milieu PCA Autres milieux: Milieu Gibson-AbdelMalek, bleu de méthylène
3-Produit chimique :	-Réactifs de Vogues Proskauer : VPI et VPII Autre : -Eau physiologie, eau oxygénée,
4-Appareillage :	-Autoclave, Etuves, pH mètre, Réfrigérateur, Vortex électrique, Microscope optique,

- **Origine des bactéries utilisées :**

Les souches utilisées sont des souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Streptococcus* fournit aimablement par Monsieur **DAHOU**.

II .3.Méthodes :

II .1.Revivification des souches lactiques :

Décongeler la souche pendant 30 min à température ambiante, puis incubée à 37 °C à 1h.

A partir de la souche conservées *Streptococcus* lactique :

La purification consiste à effectuer des repiquages sur bouillon M17 jusqu'à l'obtention de la souche pures bien distinctes et homogènes.

Les boîtes sont incubées à 42 °C à 24 heures.

II .2. Ensemencement du lait :

Ensemencé dans un flacon contenant 200ml de lait écrémé stérile 2ml de la souche *St*

Incubée à 24h à 42 °C.

II .2.1.Préparation milieu Agar au lait :

Pour 100 ml à 3%

3g \longrightarrow Agar.

1g \longrightarrow Extrait levure.

1g \longrightarrow Lait écrémé en riche au lactose.

Mélangé 50ml de lait écrémé +Agar +lait lactosé + extrait levure + l'eau distillée jusqu'à 100ml pendant 10min.

Distribué le mélange dans des flacons stérile puis autoclaves pendant 15 min à 121 °C.

Mesuré pH=6.5

❖ Préparation du Agar au lait pour but pouvoir protéolytique.

II.2.2.préparation les dilutions :

Mettre 9 ml de l'eau physiologie dans les tubes stériles 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6} - 10^{-7} - 10^{-8} .

Mettre 200ml lait écrémé dans des flacons stériles (conservé dans réfrigérateur).

II .2.3. Contrôle de la pureté de la souche bactérienne :

Cette technique consiste à effectuer des repiquages sur bouillon M17. Après croissance on procède à la purification sur milieu M17 solide. Après incubation, des colonies présentent des aspects morphologiquement différents, ont été purifiées par les méthodes des stries sur milieu M17 solide, puis incubation des boîtes à 42 °C pendant 24h.

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram avec une recherche de la catalase.

L'examen *macroscopique*, permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide. On relève la couleur, le pourtour, l'élévation, l'aspect, la pigmentation, l'opacité et le diamètre des colonies (Badis *et al.*, 2004 a).

L'observation au *microscope* permet de définir l'aspect morphologiques des isolats retenues (leur taille et mode de regroupement) (Guiraud, 1998 ; Badis *et al.*, 2004a).

II .2. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées

II .2.1. Pouvoir acidifiant :

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

On commence par la préparation de lait écrémé à 10 % dans des flacons de capacité 250 mL. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon estensemencé par une culture lactique (V/100V). Après incubation à 37 °C, à un intervalle du temps 2 h, 6 h et 24 h; 10 mL du lait est prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpen, 1997).

pHI : pH initial du lait écrémé

pHn : pH obtenu après 6 heures

Sortie le flacon de 200ml de lait écrémé, La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre.

Mesuré PH initial :

pHI= 6.61 T =25.7°C acidité= 18 °D

Ensemencé 2 ml de la souche *St* dans 200 ml lait incubée à 42 °C

II .2.2.Pouvoir coagulant :

Pour réaliser ce test, 100 ml du lait écrémé stérile a été inoculé par 3 ml de ferment. Après une incubation à 37 °C pendant 24h, on mesure le volume de lactosérum exsudé et on note l'aspect du coagulum obtenu (Bourgeois and Leveau, 1991).

II .2.3.Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10 % a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20 µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37 °C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (Veuillemard, 1986).

ajouté 1 ml du lait coagulé ensemencé dans 9 ml l'eau physiologie 10^{-1} et puis 1 ml de 10^{-1} ensemencé dans 10^{-2} jusqu'à 10^{-8} .

Après à l'aide de pipette prend 0.1ml de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}on étalé à la surface de gélose PCA (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) et M17 (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})

Incubée les boites de gélose Agar au Lait sans les disques vide à 37°C à 30 min.

Préparé les disques :

Pour déterminer l'activité protéolytique solidifiée des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface des deux boîtes de gélose Agar au Lait, Chaque disque reçoit un volume de la culture jeune *Streptococcus*. Avant incubée maître les deux boîtes dans réfrigérateur à 4 °C pendant 2 heures.

II .2.4.Pouvoir épaississant

Ce test a été réalisé par ensemencement du lait écrémé stérile reconstitué à 12 % additionné de saccharose à 12 %, par la culture du ferment (2V/ 10V). L'incubation a été faite à 37° C pendant 24h. Le levain lactique possède un pouvoir épaississant si le gel formé présente une certaine rhéologie visqueuse (Bourgeois et Leveau, 1991).

Ce test a été réalisé par ensemencement 100 ml du lait écrémé stérile reconstitué additionné de saccharose à (12 g), par 2 ml de la souche St.

Incubée pendant 24 h à 42 °C

II .2.5.Pouvoir aromatisant

La capacité des ferments mixtes à produire des composés aromatisants au cours de processus de fermentation peut être mise en évidence sur lait écrémé. Pour ce faire, chaque tube contenant du lait écrémé stérile a étéensemencé par un des ferments. Après incubation pendant 24h et coagulation du lait, les réactifs de Vogues-Proskaeur VPI et VPII ont été ajoutés et laissés reposer. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge.

Dans 03 tubes stériles chaque tube contenant du lait écrémé stérile 10 ml a étéensemencé par un des ferment 0.1 ml

—————> Incubée pendant 24h à 42 °C

II .3.Tests physiologiques et biochimiques :

II .3.1.Recherche de la catalase (Larpent er Larpent, 1997) :

Ce test consiste une clé rapide pour l'identification des bactéries lactiques. La réalisation de ce test consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre, et à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une quantité de la colonie bactérienne est prélevée et dissocier dans la goutte. La lecture concerne l'observation de tout dégagement de bulles

gazeuses qui indiquent la positivité du test. Par contre, l'absence de bulles indique une réaction négative.

II .3.2.Recherche de type fermentaire :

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié a étéensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface.

L'incubation 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 blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube (Larpent, 1997).

Ensemencé par une colonie de ST par piqûre centrale dans le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, puis un bouchon de la gélose blanche stériles sera coulé en surface. Incubation à 37 °C pendant 7 jours.

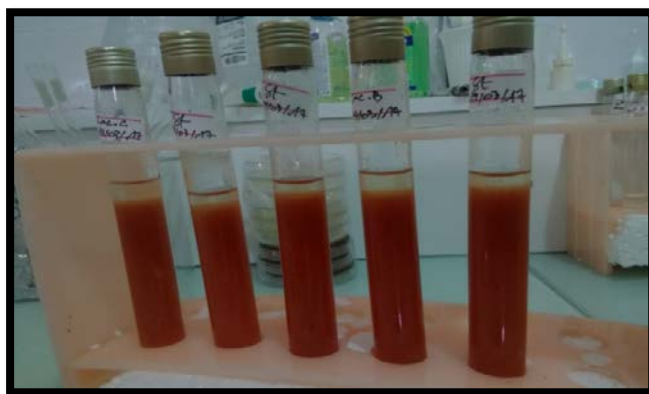


Figure 03 : Recherche de type fermentaire sur le milieu Gibson-Abdelmalek

II .3.3.culture sur lait de sherman :

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène. La souche a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3%. Après une incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait.

Ensemencé dans 10 ml de lait écrémé au une goutte bleu de méthylène Incubation à 37 °C pendant 24 h à 48h.

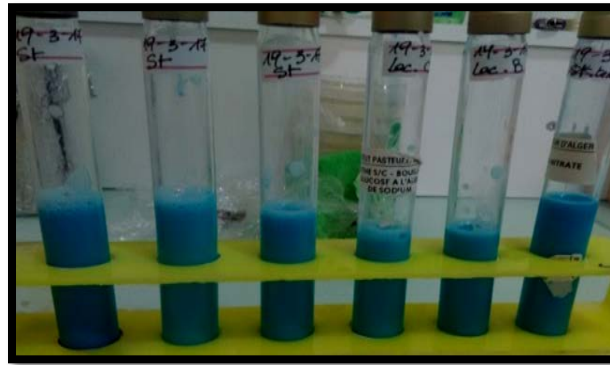


Figure 04 : culture sur lait de sherman La souche a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène

II .3.4.Conservation de la souche St :

La conservation des souches isolées pures a été réalisée sur le milieu MRS contenant du glycérol 20 % à -80 °C pour une conservation à long terme.

II .4.Fabrication d'un fromage à pate molle de type stabilisée :

II .4.1.Technologie de fabrication : La température de la salle entre 20 à 22 °C.



Figure 05 : l'hygiène de la salle (à T = 20 à 22 °C)

II .4.2.Préparation de la saumure :

Mélangé 900 g de sel +3 litres l'eau, après pasteurisation à 85°C pendant 15 second.

Laisser refroidir.

Tableau 03 : caractéristiques physico-chimiques du lait utilisé pour la fabrication du Camembert :

PH	6.71
Acidité	16 D°
Matière grasse	28 gr /L
Lactose	44 g /L
Matière protéique	27.5 gr/L

II .4.3.Préparation du lait et des ferments :

On ajoute la présure :

- temps de prise = 12 minute
- passage du PH de 6.67 à 6.35

II .4.4.Maturation : coagulation du lait : Après 2 heures 30 minutes :

Ensemencement avec 2% *Streptocoques* ,0.5% *Lactocoques*, 0.25% *Microcoques-brevibacterium* et 0.25% mélange à part égale : *pénicillium candidum*, mélange mucor et *Géotrichum candidum*.



Figure 07 : La coagulation du lait : Après 2 heures 30 minutes.



Figure 08 : La séparation lactosérum 40%.

II .4.5. Moulage pH du caillé = 6.10 :

Le moulage a été réalisé dans des moules en plastiques par la louche et ensuite gardés quelques minutes à température ambiante pendant lesquelles des retournements ont été effectués pour accomplir l'égouttage.



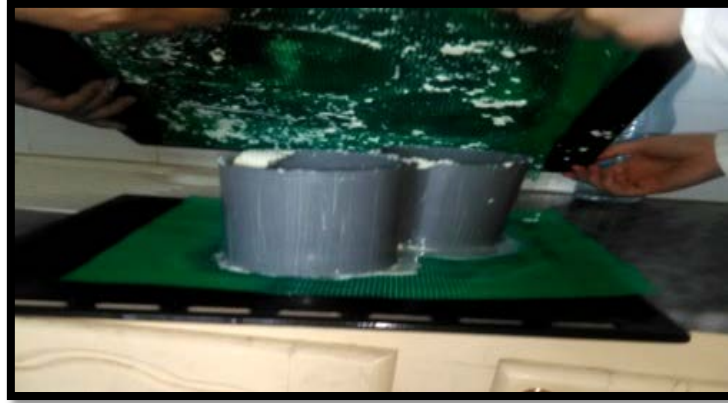
Figure 09: Le moulage et le retournement pour accomplir l'égouttage.

II .4.6.Egouttage :

Après la formation d'un caillé (un gel plus ou moins friable) ce dernier a été découpé à l'aide d'un instrument propre et le lactosérum exsudé a été éliminé. Pour faciliter l'égouttage un malaxage énergétique a été effectué pendant environ 15 min.

- Après 30 minutes : première retournement (pour faciliter l'égouttage)

T = 38 °C, PH du caillé = 6.05



- ❖ Deuxième retournement 30 min après première retournement :
T = 35 °C PH du caillé = 5,98



- ❖ Troisième retournement 30 min après deuxième retournement :
T = 31 °C PH du caillé = 5,91



- ❖ Quatrième retournement 30 min après Troisième retournement :
T = 28 °C PH du caillé = 5,87

Fin fabrication jour J : température de la salle 18 C°.

Laisser une nuit : pour but favorisé la sortie d'eau

Jour J+1 :

II .4.7.Le démoulage du fromage : PH = 4,92 température = 17 C°

EST g/100g =43 % MG = 21 % Humidité = 56,50%

02 pièces : une de 423 grammes et une de 415 grammes

Finition la forme



Figure 10: Le démoulage du fromage.

II .4.8 .le salage:

Il a un triple rôle (Mahaut M. 2000) :

- il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte;
- il règle l'activité de l'eau du fromage et par là favorise, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage. C'est donc un facteur essentiel de conservation.
- il relève la saveur du fromage et masque ou exalte le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage.

Faire fromage dans une saumure à 280 g/L de sel ensemencé avec du *pénicillium candidum* pendant 30 minutes à température 13 C°.



II .4.9-ressuyage : à 14 C° Pendant 2 heures (claie d'affinage inclinée)



II .4.10.Affinage :

L'affinage est défini comme le maintien du fromage pendant un certain temps dans des conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.

l'affinage a été établi selon les condition suivantes :

T = 13 °C

Humidité relative= 90 %

Durée d'affinage = 07 jours.



Figure 11: L'affinage du fromage dans l'étuve d'affinage.

Pulvérisation des fromages avec mélanges *penicillium candidum* – mélange mucor

Jour J+4 :

Retournement du fromage : HR =80% T =10 °C

Jour J+6 :

Retournement du fromage : HR=90% T =14 °C.

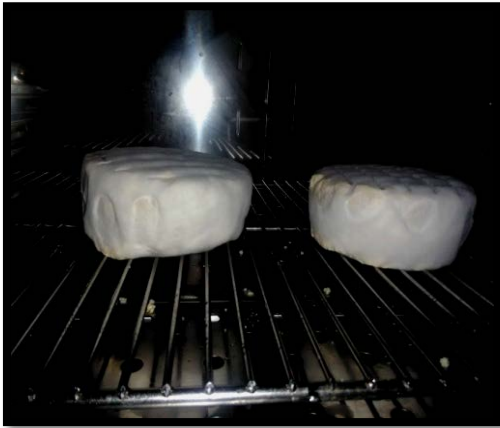


Jour J+8 :

Retournement du fromage :

HR=90%

T= 13 °C

**Jour J+9 :** Sortie-conditionnement

II .5.Contrôle microbiologique :

Préparation des dilutions décimales : A l'aide d'une spatule stérile on prélève 1g du fromage de chaque échantillons et on l'introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on obtient alors la dilution 10^{-1} , à partir de cette dernière on refait la même opération pour aboutir à la dilution 10^{-6} .

II .6.Analyse sensorielle :

Les séances de dégustation des deux fromages à pâte molle préparés, par un panel de quelques personnes non entraînés mais habitués à la dégustation de leurs fromages.

Les fiches de dégustation : La note globale intègre l'odeur du produit entier, l'aspect de la croûte et de la pâte, la texture en bouche de la pâte ainsi que la flaveur (goût et saveur).

Les fiches de dégustation permettent de porter un jugement qualitatif sur les fromages en notant différents descripteurs. Une note globale est finalement attribuée au fromage.

Les échantillons ont été présentés en même temps et déposés dans un ordre aléatoire. Les dégustateurs doivent individuellement évaluer chaque fromage selon les caractères prédéfinis. Lorsqu'ils passent d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'effacer le goût de l'échantillon précédent (Edima, 2007).

III.1-Etude morphologique:

Dans un premier temps, des tests sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches utilisées ont été effectués.

III.1.a. Critères macroscopiques:

L'observation macroscopique du développement *Streptococcus* dans le bouillon M17, apparaissent sous forme de trouble concentré au fond du tube. (Fig 12).

Sur gélose PCA_{lait}, les isolats ont données des colonies circulaires, blanches, de petites tailles d'environ 0.5 à 1 mm de diamètre, bien ronde à bords lisses. (Fig 13).

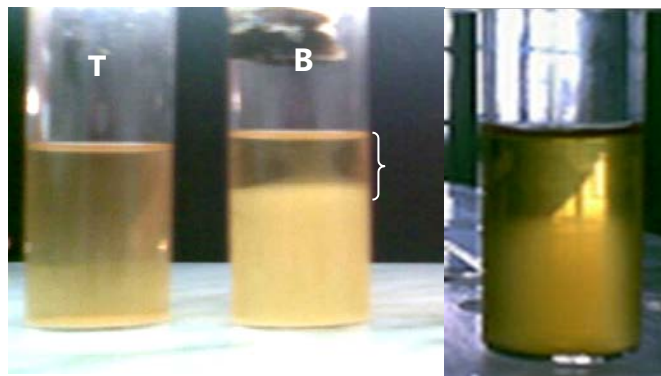
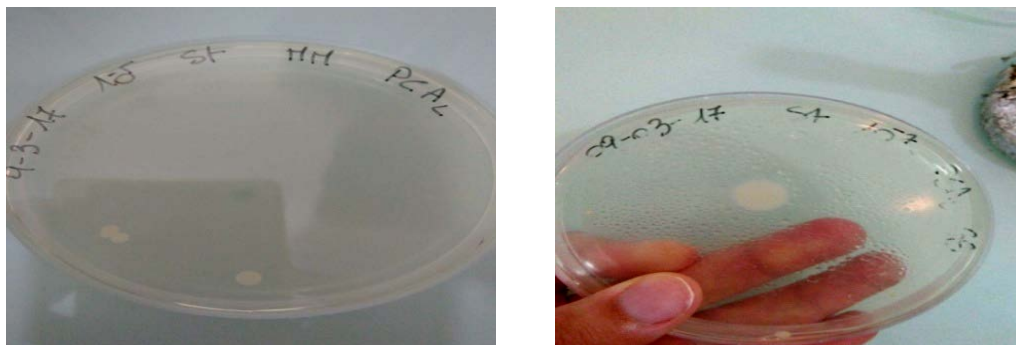


Figure 12: Aspect de culture pure *Streptococcus*, en milieu M17 liquide.

T : témoin B : culture microbien.



A : 10^{-5} .05 colonies

B : 10^{-7} .03 colonies .

Figure 13 : Aspect des colonies de *Streptococcus* obtenues après 24 h d'incubation à 30 °C sur milieu PCA Lait.

III.1. b. Critères microscopiques:

L'observation microscopique a montré que la souche est Gram-positif et catalase-négatif se présente en forme de coques disposées en diplocoques et en chaînettes.

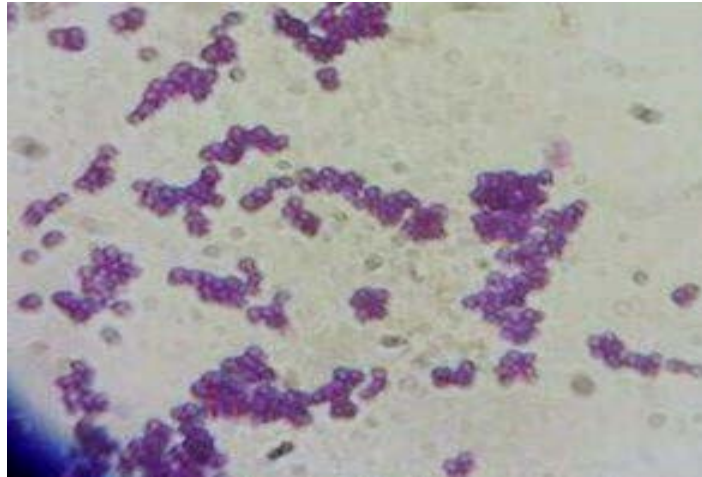


Figure 14 : Observation Microscopique d'une *Streptococcus* : des Coques (G×100).

III.2. Caractères physiologiques et biochimiques:

III.2.1. Culture sur lait de sherman :

Pas la réaction de bleu de méthylène et pas observée le virage de la couleur du bleu de méthylène au blanc indiquant une activité microbienne de la souche.



Témoin

Figure 15: Test de Sherman Les Streptocoques thermophiles sont très sensibles au colorant.

III.2.2. Recherche de type fermentaire :

Streptococcus thermophilus sont des bactéries homo-fermentaires.

III.3. Aptitudes technologiques des isolats de bactéries lactiques :

III.3.1. Pouvoir acidifiant :

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité :

Mesuré PH initial : PHi = 6.61 T°₀=25.7°C acidité= 18°D

Tableau 04 : Résultat La mesure de l'activité acidifiante et pH des différents temps.

Temps	2 h	4 h	6 h
pH	6.54	6.30	5.38
L'acidité (°D)	19	24	70
Température (°C)	25.7	25.7	/

III.3.2. Pouvoir coagulant :

La photo montre l'aspect de gel lactique formé après ensemencement par le ferment et une incubation de 24h. Il apparaît clairement que gel montre une bonne consistance et fermeté avec le peu de lactosérum. Cette qualité de gel est très demandée en industrie de fromage frais pour laquelle le gel à coagulation lactique dominante soit ferme et peu tenace.

On note l'observation de la coagulation du lait \implies les *Streptococcus* ont un pouvoir légèrement coagulant. Aspect de coagulation n'est pas bien ferme.

- Mesuré PH de sérum : PH=6.05
- Mesuré PH de lait coagulé : PH=6.03 (Problème de la température.)
- Volume de sérum : V=17,25 ml



Figure 16: Aspect du gel formé par le ferment.

III.3.3. Pouvoir épaississant :

Les propriétés texturants des bactéries lactiques sont principalement utilisées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés. De plus, elles évitent d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que les texturants et les épaississants, surtout lors de la production des yaourts (Monnet et *al.*, 2008).



Figure 17 : le gel formé sur lait saccharose épaississant filante.

III.3.4. Pouvoir aromatisant :

- Après incubation pendant 24h et coagulation du lait, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII ont été ajoutés et laissés reposer.
- L'absence l'apparition d'un anneau rouge donc absence d'arôme

Donc aucun pouvoir aromatisant qui ne va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.

III.3.5. Aptitude protéolytique :

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels pour la croissance. Il est connu que le système protéolytique des bactéries lactiques dégrade les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (El-Ghaish et *al.*, 2011).

Sur le milieu gélose Agar au lait, ont montré un bon pouvoir protéolytique qui s'est traduite par une zone claire des colonies. Les diamètres des zones d'hydrolyse étaient 15mm.

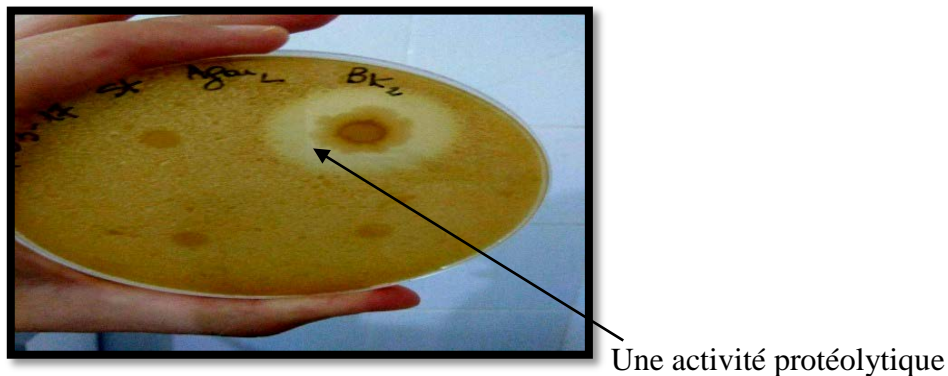


Figure 18 : Activité protéolytique chez *Streptococcus thermophilus*.

III.4.Fabrication du fromage à pâte molle stabilisée et évaluation de sa qualité :

La mise en œuvre et la commercialisation d'un nouveau ferment nécessite, de nombreux essais à l'échelle industrielle. La performance d'un ferment est estimée par la réalisation de fabrications, tout d'abord en laboratoire ou micro-fabrications, sur de faibles quantités de matières premières. Lorsque le ferment semble satisfaisant, il est ensuite testé à l'échelle pilote, avec des quantités plus importantes de matières premières et un procédé plus proche d'une production industrielle. Les caractéristiques des produits finis ainsi fabriqués sont alors évaluées et comparées avec celles d'un même produit témoin, préparé avec un ferment de référence (Luquet et Corrieu, 2005).

III.4.1. Le produit fini et le rendement fromager :

Après 07 jours d'affinages, Nous avons obtenu deux échantillons de fromage à pâte molle en forme de cylindre plat, d'un poids une 423 g et une de 415 g.



Figure 19 : deux pièces de fromage à pâte molle fabriqué.

Tableau 05 : Le rendement fromager.

Humidité (%)	MG (%)	EST (g /100g)	Rendement litre/kg
56.50	21	43	8.35

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les ferments sélectionnés présentent des bonnes aptitudes technologiques similaires à celles du ferment industriel.

D'après Cailliez-Grimal et *al.* (2007), l'activité acidifiante des bactéries lactiques conditionnent, pour une grande part, l'aptitude du lait à la coagulation, l'aptitude du caillé à l'égouttage et la composition finale du fromage.

L'humidité finale du produit est le facteur principal du rendement fromager. Elle est aussi une caractéristique principale du fromage. Le rendement dépend aussi de la richesse du lait en matière grasse et en protéines. Plus le lait standardisé est riche en protéines et en matière grasse, plus le rendement est élevé (St-Gelais et *al.*, 2002).

L'ajout du sel au caillé a des influences multiples sur la qualité finale du fromage, d'une part le NaCl offre une protection contre les microorganismes dangereux en réduisant l'activité de l'eau, d'autres part, il facilite le drainage du sérum, comme il donne un goût relevé au fromage (Alais et Linden, 1997).

III.4.2. Qualité microbiologique des fromages à pate molle fabriqués

.Recherche les *Streptococcus thermophilus* au cours l'affinage :

A l'aide d'une spatule stérile on prélève 1 g du fromage (de produit fini) on l'introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique. (Incubée à 42 °C à 24 h.). Apres incubation on observe des colonies des Streptocoque.

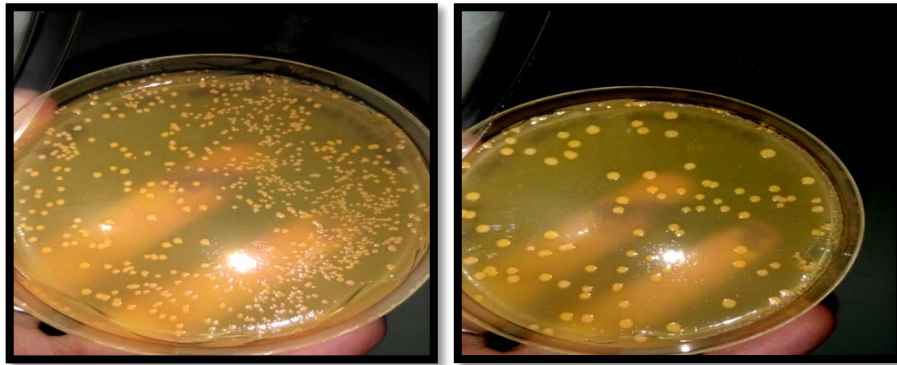


Figure 20 : la croissance les *Streptococcus thermophilus* au cours de l'affinage.

III.4.3. Qualité hygiénique

Les résultats d'analyse microbiologique ont montré l'absence des bactéries pathogènes dans l'échantillon testé.



Figure 21 : Résultat positif aucune croissance des bactéries pathogènes.

III.4.4. Qualité sensorielle :

En industrie fromagère, la qualité des fromages est largement déterminée par la perception sensorielle qui est un processus complexe. Elle est influencée par plusieurs facteurs tels que le contenu en composés aromatiques, la texture et l'apparence (Edima, 2007).

Les caractéristiques sensorielles d'un fromage sont déterminées par la composition du lait (richesse en protéines et matière grasse). Dans cette étude les caractéristiques premières des fromages ne varient pas : les fromages sont fabriqués à partir du même lait. Des ferments naturels ont été ajoutés pour améliorer le goût final.

Tableau 06 : Résultats du test de dégustation après 07 jours d'affinages :

Examen	Fromage 01	Fromage 02	Fromage 03	Fromage 04
Visuel : -Etat de la surface : - pate :	-Blanchâtre, Lisse, Epaisse -jaune pale, crevasse.	-blanche, lisse, fine -jaune pale, Crevasse.	-blanche, lisse, fine - jaune pale, cassant, Homogène.	-blanche, lisse, fine - jaune pale, Elastique souple, Homogène.
Olifatif : -Aromes, -intensité	-animal et autres -piquante	-lactique, petit lait -fade	-lactique, fermenté -fade.	-Lait frais -piquante.
Gustatif : -saveurs :	-salée, très typique	-moins salée, typique	-salée, plutôt courte.	-trop salée, très typique
Conclusion : Le fromage est :	J'aime	J'aime	J'aime	J'aime

L'évaluation sensorielle des quarts types de fromages a marqué des différences entre celui préparé à partir d'une coagulation lactique, l'odeur a été jugé lactique 100%. Les deux fromages qui fabriqué montrent une couleur blanchâtre due à la présence de la caséine dans le lait, la pate fine et nette dégage une odeur, elle est sèche et onctueuse à la fois.

Discision:

D'après ces contrôles (microbiologique, physicochimique et organoleptique), il apparaît que le fromage fabriqué à partir des ferments sélectionnés présente des qualités quasi similaires à la qualité du fromage à base du ferment industriel. Cela indique que nos souches sélectionnées possèdent des bonnes aptitudes technologiques qui peuvent être exploitées.

Un fromage de bonne qualité hygiénique doit satisfaire à certains nombres de critère particulièrement en matière de normes microbiologiques. Celles-ci ne peuvent être obtenues que par l'application des bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et les bonnes pratiques de fabrication (BPF) à tous les stades de la vie du produit.

Plusieurs facteurs sont importants lors de l'isolement de *Streptococcus thermophilus*, parmi les quels des conditions physico-chimiques favorables et un milieu de culture adéquat (facteurs nutritionnels).

Les milieux de cultures utilisés étant le M17 pour les *Streptococcus thermophilus*. Les tests biochimiques et physiologiques des *Streptococcus thermophilus* sont dépourvus de toute activité de catalase et d'oxydase, elles sont homo-fermentaires. Elles sont sensibles au lait de Shermen.

L'activité protéolytique chez les bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait, il est ainsi impliqué dans le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers fermentés (Axelsson, 1998)

D'près les résultats obtenus de l'activité protéolytique, on remarque que les *Streptococcus thermophilus* ont un bon pouvoir protéolytique, cette activité intervient dans les caractéristiques des produits laitiers fermentés, la protéolyse est à l'origine de l'apparition de nombreux composée aromatiques ou leur précurseurs et joue aussi un rôle dans la texture des fromages (Hemme et *al.*, 1982).

L'acidification du lait est essentiellement due la production de l'acide lactique qui varie selon les souches (Larpen, 1987). L'activité acidifiante à été estimée d'une part par culture des souches (*Strp*) dans le lait écrémé et par la mesure du pH toutes les heures.

Après 6 h d'incubation la souche à un pouvoir acidifiant, il existe une relation entre le pH et l'acidité dornic. On observe sur le temps de coagulation à mesure que la quantité lactique produite augmente, le pH diminue. Notons également que le pouvoir acidifiant de certaines souches de *Streptocoques* diminue en fonction du temps.

L'absence des bactéries pathogènes dans ces produits est la conséquence de l'utilisation de matières premières de qualité microbiologique satisfaisante et du respect des règles de l'hygiène durant les opérations de préparation du fromage.

Conclusion

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire afin d'exploiter leur pouvoir acidifiant et aromatisant (fabrication de fromages). Ces bactéries ont la capacité de synthétiser des substances à effet inhibiteur, ce qui a attiré l'attention des chercheurs dans les dernières années afin de les utiliser comme bio-conservateurs et d'augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires.

La fabrication fromagère repose sur l'utilisation de deux ingrédients complexes et variables : le lait et les ferments. Son efficacité diminue avec le temps ou dépend des paramètres du milieu. Ces trois facteurs sont à la base même des problèmes de fromagerie auxquels il faut ajouter la complexité, le nombre et la durée des étapes de fabrication.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, les *Streptococcus thermophilus* avaient de bonnes fonctionnalités technologiques (bonne d'activité acidifiante, l'activité protéolytique et texturant). Ces ferments ont montré un bon pouvoir coagulant, épaississant et une capacité à produire des composés aromatiques.

L'activité protéolytique des ferments constitués est d'un intérêt capital pour l'industrie fromagère. On note le rôle des bactéries lactiques thermophiles acidifiantes dont les Streptocoques thermophiles dans l'optimisation de la durée d'affinage "réduction du temps d'affinage" par leur aptitude protéolytique accentuée qui favorise l'affinage ; maturation accélérée des fromages sans influencer sur la texture (soit une stabilité au cours de la conservation à cause de la maîtrise technologique de la post-acidification à l'égouttage et la maîtrise de l'évolution du pH du fromage qui se situe en fin d'affinage autour de 5,8)

Enfin, l'utilisation des ferments mixtes dans la fabrication d'un fromage de type pâte molle stabilisée a permis l'obtention d'un meilleur rendement fromager avec des qualités physicochimique, microbiologique et sensorielle du produit fini acceptables comparativement au fromage à base d'un ferment industriel.

Perspectives :

Les résultats de notre recherche permettent le domaine des bactéries lactiques et des technologies laitiers ont conduit les producteurs comme les utilisateurs à mieux maîtriser.

Les bactéries lactiques (*S. thermophilus*) au cours de la fabrication d'un fromage à pâte molle de type stabilisé, et pouvant ainsi composer un écosystème de fromage de type stabilisé.

Les contrôles de la qualité de produit fini dépendent en grand parties de la composition et de la vie des communautés microbiennes, en perpétuelle évolution lors de la fabrication et de l'affinage des fromages. Ces contrôles pour but d'inhiber le développement des flores pathogènes.

A

Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17: 454-461.

AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. and CHEVALLIER I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. vol. 17, 454-461.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., CoccagnBousquet 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. Classification and physiology. In : *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

Axelsson, L., (1998). Lactic acide bacteria: classification and physiology In: Salminen,S., von Wright, A. (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Macel Dekker, New York, pp.1-72

B

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

Beal C., Louvet P. and Corrieu G.(1989). *applied microbiology and Biotéchnology*.32 : 148-154.

BELYAGOUBI L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen. 170p.

Bernardeau M, Vernoux J.P, Dubernet S.H, Guégueu M., 2008 : Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**: 278-285.

biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29.P591-610.

Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996. Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704.

Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007. Microbiochimie et alimentation. Educagri Edition. 166-168.

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

C

CASALTA E., VASSAL Y., DESMAZEAUD M.J. and CASABIANCA F., 1995. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technology* 28, 291299.

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.

Chamba, J.F and F .Prost (1989). Mesure de l'activité acidifiante des Bactéries lactique, thermophiles pour la fabrication de fromage à pate cuite. *Lait*, (69) :417-431.

CHAVARRI E.J., NUNEZ J.A. and NUNEZ M., 1983. Behavior of *Streptococcus lactis* in heat treated (80 °C for 30 min) or sterilized cow's or ewe's milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 357-363.

Cholet,O.(2006). Étude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.P16.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993. Taxonomic studies of some Leuconostoc like organisms from fermented sausages, description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75) : 595-603.

D

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

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

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M., Janssens, C. (1994). In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : P25-114.

Delorme C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology.* **126:** 274-277

Desmazeaud M., 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3

Desmazeaud M.J., 1996 : les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahier d'Agricultures.***5(5) :** 331-342.

Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N.P., 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. 86 : 21-38.

Dortu C. et Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 13(1) : 143-154. fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. P432-704.

G

Gardinier G., Ross R.P., Collins J.K., Fitzgerald G. et Stanton C., 1998. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Env. Microbiol.* 64 : 2192-2199

Gerrit,S., Bart A-S.,et Wim J-M-E.(2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and
Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237251.

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.

Guiraud, J-P.,Rosec J-P.(2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. P237-251.

H

Haddie J.M., 1986. Other streptococci. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070

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.

HEMME D. and FOUCAUD-SCHEUNEMANN C., 2004. Review *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14, 467–494.

Ho T.N.T., N. 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.

HOLT G.J., KRIEG N.R. SNEATH P.H.A., STALEY J.T. and WILLIAMS S.T., 1994. Gram positive cocci. In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed., pp. 527). Baltimore: Williams & Wilkins.

J

JEANTET R., CROGUENNEC T., MADRANT., SCHUCK P. et BRULE G., 2008. Les produits laitiers, 2ème édition TEC et DOC Lavoisier, 185p.

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

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.

L

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250.

Laurent,S. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. P307.

LAW J. and HAANDRIKMAN A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.

Leclerc,H., Gaillard, F-L., Simonet, M., (1994). Les grands groupes de bactéries. *In* : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN.* Paris. 445.

Leroy F. et De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15 : 67-78.

Leroy F. et De Vuyst L., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13 : 194-199

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

M

MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.

MAKHLOUFI K.M., 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.

Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M., 2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.

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

Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell. Publishing. 13.

O

OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. and SAÏHI A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Leuconostoc genus. Int. J. Food Microbiol. 126: 286-290.

P

Picon A., Garcia-Casado M.A. et Nunez M. 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild Lactococcus lactis strains. Int. Dairy J. 20: 156-162.

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

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

Pot B., Devriese L.A., Uris D, Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of Lactococcus strains isolated from animals. Syst. Appl. Microbiol. 19 : 213-222.

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. *European. J. Sci. Res.* 34 (2). P 218-227.

ROUISSAT L. and BENSOLTANE A., 2006. Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567-582.

S

Savadogo, A., et Traore, A.S., 2011. La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-20
International Journal of Biological and Chemical Sciences. Burkina Faso.

Savijokie K., Ingmer H. et Varmanen P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.

Siegumfeldt, H., Rechinger, K-B., Jakobsen, M., (2000). Dynamic changes of intracellular Ph in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66: P2330-2335.

St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R., 2002. Fromage. In : *Science et technologie du lait : transformation du lait* (Vignola C.L.). Presses. Int. Polytechnique. 349-407.

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

Sun,Zh., Yu,J., Dan,T., Zhang,W., Zhang,H. (2014). Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria . In: *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*. Springer. P 1-78.

T

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

TEIXEIRA L.M., CARVALHO M.G.S. and FACKLAM R.R., 1999. *Vagococcus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson R.K. Oxford, Elsevier. 2215-2220.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 239-290

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

V

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K. et Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407

VEDAMUTHU E.R., 1994. The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77, 2725–2737.

W

Williams A.G., Noble J. et Banks J.M., 2001. Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 11 : 203-215

Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J. et Smit G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12 : 91-109.

Annexe 01: Milieux de culture (Guiraud, 2003)

1-Gélose Plate Count Agar (PCA):

Gélose pour numérotation Peptone 5,0 g

Extrait de levure 2,5 g

Glucose (Facultatif) 1,0 g Gélose 15,0 g

Eau distillée qsp 1000 mL

pH= 7,2

Stérilisation : 120°C pendant 20 minutes.

2- Bouillon M17:

Bouillon de Terzaghi Peptone de soja 5,0 g

Peptone de viande 2,5 g

Peptone de caséine 2,5 g

Extrait de viande 5,0 g

Extrait de levure 2,5 g

Lactose 5,0 g

Acide ascorbique 0,50 g

Glycérophosphate de sodium 19,0 g

Sulfate de magnésium 0,25 g

Eau distillée qsp 1000 mL

pH 7,2

Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes.

3-Gélose M17 :

Gélose de Terzaghi Peptone de soja 5,0 g

Peptone de viande 2,5 g

Peptone de caséine 2,5 g

Extrait de viande 5,0 g

Extrait de levure 2,5 g

Lactose 5,0 g

Acide ascorbique 0,5 g

Glycérophosphate de sodium 19,0 g

Sulfate de magnésium 0,25 g

Gélose 13,0 g

Eau distillée qsp 1000 mL

Stérilisation : 120°C pendant 15 minutes

4-Milieu Gibson-Abdelmalek (pH 6.5)

Extrait de levure 2.5g

Glucose 50g

Jus de tomate 100ml

Lait 800ml

Gélose nutritive ordinaire 200ml

Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

Annexe II : Coloration de Gram

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

Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;

Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;

Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;

Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;

Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;

Laver à l'eau ;

Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

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