

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences biologiques



Mémoire de Master Académique / Professionnel

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

THEME

**ESSAI D'ÉLABORATION D'UN FERMENT LACTIQUE
D'ORIGINE VÉGÉTALE.**

Présenté par :

Melle BENBRAHIM Maria

Soutenu publiquement :

Le 22 /06/2025

Devant le jury :

Mme. KHALLEF Sakina

Présidente

Grade M.C.A UKM Ouargla

Mme. SOUID Wafa

Promotrice

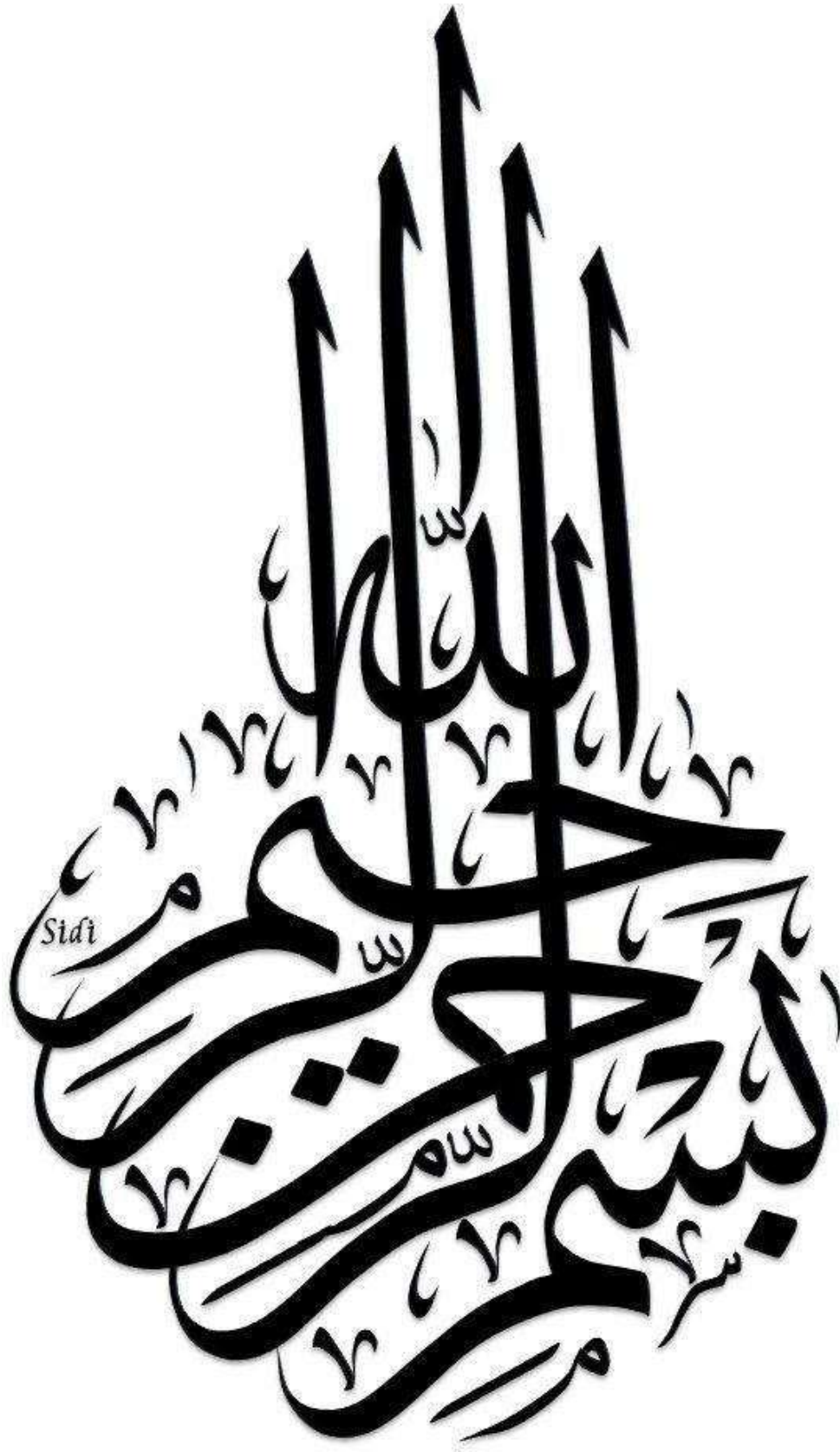
Grade M.C.B UKM Ouargla

Mme. ATTAB Sara

Examinatrice

Grade M.C.B UKM Ouargla

Année Universitaire : 2024/2025



Remerciements

Avant toute chose, mes plus sincères remerciements vont à « Dieu », source de force, de patience et de sagesse, qui m'a accompagnée et soutenue tout au long de ce parcours.

J'adresse mes profonds remerciements à Mme KHALLEF S., présidente du jury, et à, Mme ATTAB S., examinatrice de ce mémoire pour l'honneur qu'elles me font en acceptant de consacrer leur temps et leur expertise à l'évaluation de mon travail.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à mon encadrante, Mme SOUID W., pour son accompagnement précieux, ses orientations scientifiques, sa disponibilité constante et son soutien tout au long de ce travail. Son investissement et ses conseils avisés ont été essentiels à la bonne réalisation de ce mémoire.

Je remercie vivement l'ensemble du personnel des laboratoires de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, ainsi que du Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage (CACQE) de Ouargla, pour leur accueil, leur assistance technique et les moyens matériels mis à ma disposition au cours de la réalisation de ce travail expérimental.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des enseignants et du personnel administratif de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, dont l'enseignement de qualité, la rigueur et le dévouement ont largement contribué à ma formation et à l'acquisition de mes compétences scientifiques tout au long de mon parcours universitaire.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille, mes amis et toutes les personnes chères qui m'ont soutenue, encouragée et accompagnée avec patience et bienveillance tout au long de cette aventure académique.

À toutes et à tous, recevez l'expression de ma plus profonde reconnaissance.



Dédicace

Avec une immense gratitude et un cœur rempli d'émotions, je dédie humblement le fruit de ce travail à celles et ceux qui ont, chacun à leur manière, marqué mon parcours.

*À mon cher père, Mounir,
Pour ta sagesse, ton soutien silencieux et constant, pour tes sacrifices quotidiens et ton amour indéfectible. Ta force et tes efforts ont été les racines de mon cheminement. Rien ne saurait exprimer toute ma reconnaissance.*

*À ma précieuse mère, Fahima,
Pour ton amour inépuisable, ta patience sans limite et ta tendresse qui m'ont toujours portée, même dans les moments les plus difficiles. Tes encouragements et tes prières ont été ma lumière dans les périodes d'incertitude.*

*À ma sœur **Maroua**,
si précieuse et chère à mon cœur,
Parce que tu es un véritable rayon de soleil dans ma vie, une source d'inspiration et de réconfort par ta force intérieure et ton amour sincère. Ta présence a toujours été un soutien inestimable.*

*À mes frères et sœurs,
Merci pour votre présence à mes côtés tout au long de ce parcours.*

*À mon amie de cœur, **Hiba**,
Pour ton soutien constant, ta bienveillance, ton écoute et ta présence précieuse à chaque étape de ce long voyage. Merci du fond du cœur pour chaque mot, chaque geste et chaque sourire partagés. Ta fidélité a été l'une de mes plus grandes forces.*

*À mon amie **Ahlam**,
Pour ton amitié sincère et tes encouragements qui ont su apaiser bien des moments de doute.*

*À toute la famille. « **Benbrahim** » et « **Boussaïd** »*

*À mes camarades et amis de la promotion de **Microbiologie**, de la **Licence 3 (2022)** jusqu'au **Master 2 (2025)**,*

Merci pour ces années d'entraide, de partages, de rires et de travail acharné. Ces souvenirs communs resteront gravés.

Enfin, à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont encouragée, soutenue ou inspirée à poursuivre ce parcours académique, je dédie également ce travail.

Avec toute ma reconnaissance et mon affection.

BENBRAHIM Maria

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

Introduction

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

I.1. Généralités et caractéristiques	02
I.2. Classification des bactéries lactiques	02
I.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	03
I.4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	07
I.4.1. Métabolisme des glucides	07
I.4.2. Métabolisme du citrate.....	09
I.4.3. Métabolisme des protéines	10
I.4.4. Métabolisme des lipides.....	10
I.5. Rôles des bactéries lactiques	10

Chapitre II : Les ferments lactiques.

II.1. Définition.....	12
II.2. Les principaux microorganismes fermentaires	12
II.2.1. Les bactéries lactiques	12
II.2.2. Les bactéries acétiques.....	12
II.2.3. Les levures (ferments alcooliques)	13
II.2.4. Les bactéries propionique.....	13
II.2.5. Les moisissures	13

II.3. Types de ferments lactiques	14
II.4. Critères de sélection des ferments lactiques	15
II.4.1. Critères de sécurité	15
II.4.2. Aptitudes technologiques	15
II.5. Production de ferments lactiques	17
II.6. Role de ferments lactiques en fromagerie	18

Partie Pratique

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Lieu du travail	19
I.2. Matériels	19
I.3. Méthodes	20
I.3.1. Isolement des bactéries lactiques	20
I.3.2. Purification des souches lactiques	21
I.3.3. Conservation des isolats	21
I.3.4. Pré-Identification des souches lactiques	21
I.3.4.1. Examen macroscopique	21
I.3.4.2. Examen microscopique	21
I.3.4.3. Recherche de la catalase	22
I.3.4.4. Tests physiologiques	22
I.3.4.4.1. Croissance à différentes températures	22
I.3.4.4.2. Test de la thermorésistante	22
I.3.4.4.3. Croissance à 6.5% de NaCl	22
I.3.4.4.4. Croissance à pH 9.6...	22
I.3.4.4.5. Type fermentaire	22
I.3.4.4.6. Hydrolase de l'arginine	23
I.3.4.4.7. Test de lait bleu de Sherman	23
I.3.4.4.8. Études du profil fermentaire des sucres	23
I.3.4.5. Étude de l'Aptitude technologique des souches lactiques	24
I.3.4.5.1. L'activité acidifiante	24

I.3.4.5.2. Activité protéolytique	24
I.3.4.5.3. Activité texturant	24
I.3.4.5.4. Activité lipolytique	24
I.3.4.5.5. Activité aromatisante	25
I.3.4.5.6. Pouvoir antimicrobien	25
I.3.4.5.7. Pouvoir antagoniste des souches lactiques	25
I.3.4.6. Essai de fabrication de fromage frais par les ferments lactiques sélectionnés	26
I.3.4.6.1. Choix du ferment lactique	26
I.3.4.6.2. Technique de production	26
I.3.4.6.3. Analyse sensorielle du fromage produit	28
Chapitre 2 : Résultats et discussion	
II.1. Isolement des bactéries lactiques	29
II.2. Pré-identification des isolats	30
II.2.1. Pré-identification physico-chimique	30
II.2.1.1. Croissance à différentes températures	30
II.2.1.2. Croissance à 6.5% de NaCl	31
II.2.1.3. Croissance à pH 9.6	31
II.2.1.4. Test de thermorésistance	31
II.2.1.5. Type fermentaire	32
II.2.1.6. Hydrolase de l'arginine	33
II.2.1.7. Test de lait de Sherman	33
II.2.1.8. Fermentation des sucres	34
II.3. Aptitudes technologiques	37
II.3.1. Activité acidifiante	37
II.3.2. Activité protéolytique	39
II.3.3. Activité lipolytique	39
II.3.4. Activité texturante	40
II.3.5. Activités aromatisants	41
II.3.6. Activité antimicrobienne	42

II.3.7. Activité antagoniste inter-souches	42
II.4. Production de fromage	43
II.4.1. Fabrication et rendement de fromage	43
II.4.2. Analyse sensorielle	44
III. Conclusion	46
IV. Références bibliographiques	48
V. Annexes	

Résumé

Ces dernières années, un intérêt croissant est porté aux bactéries lactiques issues de végétaux pour leurs applications dans l'industrie agroalimentaire. Ce travail a pour objectif l'isolement, la caractérisation et la valorisation de souches lactiques à partir de fruits et légumes frais (dattes, olives, oranges et piments) en vue de leur utilisation comme ferments dans l'industrie alimentaire.

25 isolats Gram positifs et catalase négatifs ont été sélectionnés après isolement. Les tests physiologiques ont montré une prédominance de souches mésophiles, thermotolérantes, homofermentaires, mais sensibles à 6,5 % de NaCl et au pH 9,6. L'étude de leur aptitudes technologiques a révélé une acidification rapide chez certaines souches, une production variable des exopolysaccharides, une faible activité aromatisante et une absence d'activités protéolytique, lipolytique et antimicrobienne.

05 isolats lactiques ont été testés pour leur compatibilité dont deux seulement ont été retenues pour construire des ferments purs ou mixte utilisés pour la fabrication du fromage frais. L'analyse sensorielle des 03 types du fromage frais obtenus a montré une bonne acceptabilité globale, avec une préférence marquée pour le fromage issu d'une souche pré-identifiée comme *Enterococcus faecalis* isolée à partir des dattes.

Mots-clés : Bactéries lactiques, fruits et légumes, isolement, fermentation, fromage frais, *Enterococcus faecalis*.

Abstract

In recent years, there has been growing interest in lactic acid bacteria from vegetables for their applications in the food industry. This work aims to isolate, characterize, and valorize lactic acid strains from fresh fruits and vegetables (dates, olives, oranges, and peppers) for use as ferments in the food industry.

25 Gram-positive and catalase-negative isolates were selected after isolation. Physiological tests showed a predominance of mesophilic, thermotolerant, homofermentative strains, but sensitive to 6.5% NaCl and pH 9.6. The study of their technological aptitudes revealed rapid acidification in some strains, variable production of exopolysaccharides, low flavoring activity, and an absence of proteolytic, lipolytic, and antimicrobial activities.

Five lactic acid isolates were tested for their compatibility, of which only two were selected to construct pure or mixed cultures used for the production of fresh cheese. Sensory analysis of the three types of fresh cheese obtained showed good overall acceptability, with a marked preference for cheese produced from a strain pre-identified as *Enterococcus faecalis* isolated from dates.

Key words: Lactic acid bacteria, fruits and vegetables, isolation, fermentation, fresh cheese, *Enterococcus faecalis*.

ملخص

في السنوات الأخيرة، تزايد الاهتمام بالبكتيريا اللبنية المعزولة من النباتات لاستخدامها في صناعة الأغذية. يهدف هذا العمل إلى عزل وتوصيف وتثمين سلالات البكتيريا اللبنية من الفواكه والخضراوات الطازجة (التمر والزيتون والبرتقال والفلفل) لاستخدامها كمخمرات في صناعة الأغذية.

تم اختيار 25 عزلة موجبة الجرام وسالبة الكاتالاز بعد العزل. أظهرت الاختبارات الفسيولوجية غلبة السلالات المحبة للحرارة المتوسطة والمتحملة للحرارة و *homofermentaires* ، ولكنها حساسة لتركيز 6.5% من كلوريد الصوديوم ودرجة حموضة 9.6. كشفت دراسة قدراتها التكنولوجية عن سرعة تحمض بعض السلالات، وإنتاج متفاوت للسكريات الخارجية، وانخفاض نشاط إنتاج النكهة، وغياب الأنشطة التحليلية للبروتينات والدهون والمضادة للميكروبات. تم اختبار توافق خمس عزلات من البكتيريا اللبنية ، اختير منها اثنتان فقط لبناء مزارع نقية أو مختلطة تُستخدم في إنتاج الجبن الطازج. أظهر التحليل الحسي لأنواع الجبن الطازج الثلاثة المُحصَّلة قبولاً عاماً جيداً، مع تفضيل واضح للجبن المُنتج من سلالة مُحدَّدة مسبقاً باسم *Enterococcus faecalis* ، المعزولة من التمور.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبنية ، الفواكه والخضراوات، العزل، التخدير، الجبن الطازج، *faecalis*، *Enterococcus*

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

BL : Bactéries lactiques

CACQE : Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage

UFC : Unité formant colonie

E. Coli : *Escherichia Coli*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *lactococcus*

MRS : Man Rogosa Sharpe (milieu de culture pour bactéries lactiques)

MSE : Mayeux, Sandine & Elliker medium

NaCl : Chlorure de sodium

pH : Potentiel Hydrogène

rpm : round per minute

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de la pré-identification des souches lactiques.

Tableau 2 : Évolution de l'activité acidifiante des souches sélectionnées.

Liste des figures

- Figure 1 :** Lactobacillus delbrueckii, microscopie électronique à balayage.
- Figure 2 :** Streptococcus sp., micrographie électronique à balayage.
- Figure 3 :** Lactococcus lactis, micrographie en contraste de phase.
- Figure 4 :** Schéma du métabolisme des bactéries lactiques.
- Figure 5 :** Structure d'exo-polysaccharide produit par les LAB.
- Figure 6 :** Etapes de fabrication de fromage frais.
- Figure 7 :** Aspect des cultures lactiques sur MRS liquide.
- Figure 8 :** Aspect macroscopique des cultures sur milieu MRS gélosé après incubation.
- Figure 9 :** Les résultats de coloration de Gram.
- Figure 10 :** Proportions des souches lactiques isolées à partir des différents échantillons végétaux.
- Figure 11 :** Résultats de croissance à 45°C.
- Figure 12 :** Résultats positifs de la croissance aux 6.5% de.
- Figure 13 :** Résultats de la croissance en pH=9.6.
- Figure 14 :** Résultats de la thermo-résistance.
- Figure 15 :** Résultats de type fermentaire.
- Figure 16 :** Résultats de l'hydrolase.
- Figure 17 :** Résultats positives de test de lait bleu de Sherman.
- Figure 18 :** Résultats de fermentation de sucre après 48h.
- Figure 19 :** Évolution de la production d'acide lactique en fonction du temps.
- Figure 20 :** Évolution du pH en fonction du temps.
- Figure 21 :** Résultat de l'activité protéolytique.
- Figure 22 :** Résultats de l'activité lipolytique.
- Figure 23 :** Les résultats de test de l'activité texturant.
- Figure 24 :** Résultat positif de l'activité aromatisant
- Figure 25 :** Résultats de test d'activité antagoniste.

Figure 26 : Le fromage obtenu pendant l'égouttage.

Figure 27 : Aspect visuel des fromages frais obtenus avec les souches D05, D06 et leur association.

Figure 28 : Répartition des notes attribuées aux critères sensoriels des fromages expérimentaux

Introduction

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe important de microorganismes ubiquistes, largement rencontrés dans divers environnements naturels tels que les produits laitiers, les viandes, les céréales, ainsi que les fruits et légumes. Elles sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour leurs capacités de fermentation, leur innocuité et leurs multiples bénéfices nutritionnels et technologiques (**Zhang et Cai, 2014**).

En tant que ferments, les bactéries lactiques jouent un rôle central dans la production de nombreux aliments fermentés, notamment les fromages, les yaourts, les légumes saumurés, les boissons fermentées et d'autres produits traditionnels. Elles contribuent à la conservation, à l'acidification du milieu, au développement de la texture et à la libération d'arômes caractéristiques (**Demir et Belarbi, 2020**).

L'intérêt croissant pour les bactéries lactiques issues de matrices végétales réside dans leur adaptation naturelle à des environnements riches en sucres simples et en composés phénoliques. Elles peuvent produire des exopolysaccharides (EPS), contribuer à la texture des aliments fermentés, développer des arômes caractéristiques, et parfois exprimer des activités antimicrobiennes. Ces caractéristiques leur confèrent un potentiel intéressant pour le développement de nouveaux ferments d'origine végétale, utilisables dans différents procédés agroalimentaires (**Bouricha, 2022**).

Dans ce cadre, le présent travail consiste à isoler et à caractériser des souches de bactéries lactiques issues de différents végétaux (dattes, olives, oranges, poivrons), puis à évaluer leurs aptitudes technologiques, dans le but de sélectionner des souches utilisées par la suite en tant que ferments dans la fabrication des produits alimentaires fermentés.

Ce travail est structuré en 03 grandes parties : une partie bibliographique axée sur une étude approfondie des bactéries lactiques et leurs rôles dans l'industrie alimentaire ; la deuxième partie est expérimentale, elle est consacrée à l'isolement, la caractérisation des souches lactiques, ainsi que l'étude de leurs aptitudes technologiques puis l'essai de leur application en tant que starter dans la production du fromage frais. Enfin, les résultats obtenus ont été présentés et discutés dans la troisième partie résultats et discussion.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I. Les bactéries lactiques

1.1. Généralités et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des organismes fermentaires qui génèrent de l'acide lactique en tant que produit final majeur de la fermentation. Ces microorganismes sont fréquemment employés pour la production et la préservation des aliments. Les bactéries lactiques sont des coques ou bâtonnets, gram positive, généralement immobiles non sporulants, manquant d'oxydase et de catalase, anaérobies facultatifs avec un métabolisme exclusivement fermentaire. L'acide lactique est le principal ou l'unique produit de fermentation généré par chaque bactérie lactique (Madigan et al, 2022). On les divise en bactéries homofermentaires qui ne produisent que de l'acide lactique et bactéries hétérofermentaires qui produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et/ou de l'éthanol (**Hami et Terras, 2020**).

Les BL sont fréquemment observés dans l'environnement naturel. Elles se trouvent partout et se manifestent dans divers habitats écologiques. Elles sont associées aux habitats riches en nutriments, comme les plantes, ainsi que divers produits alimentaires (lait, viande, boissons et végétaux), mais d'autres sont aussi présents dans la flore normale de la bouche, de l'intestin et du vagin des mammifères (**Salminen et al., 2004 ; Carina Audisio et Maria, 2010**).

1.2. Classification des bactéries lactiques

Le mot « bactéries lactiques » n'a pas une définition taxonomique rigoureuse, ce qui signifie que leurs membres peuvent présenter une diversité taxonomique. Ce groupe phylogénétique est composé d'environ 500 espèces valablement décrites, appartenant à six familles de bactéries Gram (+) à faible teneur en GC, en particulier :

1. Aerococcaceae, avec les genres *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* et *Ignavigranum*.
2. Carnobacteriaceae, avec les genres *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus*, et *Trichococcus*.

3. Enterococcaceae, avec les genres *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.
4. Lactobacillaceae, avec les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.
5. Leuconostocaceae, avec les genres *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* et *Weissella*.
6. Streptococcaceae, avec les genres *Lactococcus*, *Lactovum* et *Streptococcus* (Fernanda et al, 2016).

En se basant sur l'étude des relations phylogénétiques, on peut classer les bactéries lactiques en Firmicutes et Actinobactéries, comprenant 41 genres. Récemment, d'autres genres de bactéries lactiques comprennent : *Fructobacillus*, *Lacticigenium*, *Pilibacter* et *Sharpea* ont été découvert. Ce sont des genres inédits de bactéries lactiques qui n'ont pas fait partie du manuel Bergey's of Systematics of Archaea and Bacteria publié en 2015. Alors que Le genre *Bifidobacterium*, appartenant au phylum des Actinobacteria, se distingue des autres bactéries lactiques classiques (Firmicutes) par sa teneur élevée en bases GC, bien que l'identification repose également sur le gène 16S rRNA. (Wei et Arjan, 2018).

1.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

Lactobacillus : Forme d'un bâton, non sporulant et catalase négative. On les reconnaît pour leur aptitude à convertir les sucres en acide lactique, et ils sont fréquemment présents dans les aliments fermentés ainsi que dans le système digestif humain. À l'origine, les espèces du genre *Lactobacillus* ont été classé en fonction de leur température de croissance et leurs capacités à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire, Cette classification est la seule reconnue, bien qu'elle soit imparfaite car le séquençage de l'ADNr16S a montré que des bactéries lactiques classées selon des caractères phénotypiques sont en réalité de parente phylogénique très éloignée. De plus, le contenu en GC% qui varie énormément d'une espèce à une autre (32 à 53%) et l'absence d'homologie ADN/ADN

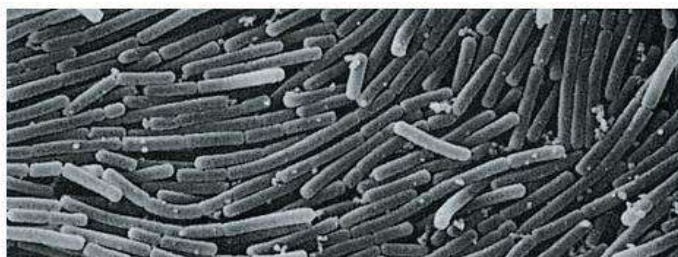


Figure 1 : *Lactobacillus delbrueckii*, microscopie électronique à balayage. (Michael T. et al., 2021)

significative entre beaucoup d'espèces, sont aussi le reflet d'une parente phylogénique éloignée (Haydersah, 2010; Demir et Bearbi, 2020).

Bifidobacterium : Le genre *Bifidobacterium*, appartenant à la famille des Bifidobacteriaceae, est probablement le plus étudié de cette famille. Ces bactéries sont Gram-positives, anaérobies stricts, non sporulées, immobiles, et généralement non productrices de gaz. Leur morphologie est en forme de bâtonnets, souvent irréguliers, en forme de V ou de Y, d'où leur nom. Bien que phylogénétiquement distinctes des bactéries lactiques classiques, les bifidobactéries sont souvent incluses dans la famille fonctionnelle des bactéries lactiques (LAB) en raison de leurs propriétés métaboliques similaires (Savadojo et Traore, 2011; Zhang et Cai, 2014 ; Nakaâ et Bouderdâ, 2017). Leur contenu en bases G+C est élevé, allant de 42 % à 67 %, et la plupart des espèces sont strictement anaérobies, bien que certaines comme *B. psychraerophilum*, *B. scardovii* et *B. tsurumiense* soient capables de tolérer l'oxygène et de croître dans des conditions aérobies (Zhang et Cai, 2014). La température optimale de croissance se situe entre 37 °C et 41 °C, avec des limites allant de 25 °C à 45 °C, tandis que le pH optimal est compris entre 6,5 et 7,0. Phylogénétiquement, leur position a été confirmée par l'analyse des séquences du gène 16S rRNA. Sur le plan métabolique, elles utilisent une voie spécifique pour la dégradation des hexoses, connue sous le nom de **voie bifide** (*bifid shunt*), et leur génome varie entre 1,9 et 2,8 Mb (Zhang et Cai, 2014).

Enterococcus : Le genre *Enterococcus* est un groupe de bactéries appartenant à la famille des Enterococcaceae, à l'ordre des Lactobacillales et au phylum des Firmicutes. Ce genre regroupe la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (streptocoques fécaux), et se caractérise par une hémolyse de type α ou β , une capacité de développement à 10 °C et 45 °C, une croissance en présence de 6,5 % de NaCl et une grande résistance aux facteurs environnementaux (Galvez, 2012 ; Guiraud, 2012). Leur morphologie est similaire à celle d'autres genres de la même famille, avec des cellules ovoïdes, Gram-positives, qui apparaissent seules, en paires ou en courtes chaînes. Les espèces les plus couramment rencontrées dans l'alimentation sont *Enterococcus faecalis* (anciennement *Streptococcus faecalis*), *E. durans* et *E. bovis*, qu'on retrouve dans des habitats variés tels que l'intestin de l'homme et des animaux, les produits végétaux, le sol et les produits laitiers. Ces espèces partagent également la capacité à croître dans un bouillon contenant 6,5 % de NaCl et à un pH de 9,6 (Zhang et Cai, 2014). Les entérocoques jouent un rôle important

dans la maturation des fromages, où leur activité enzymatique contribue au développement des arômes et de la texture (Chethouna, 2020).

Streptococcus : Le genre *Streptococcus* regroupe des bactéries à morphologie sphérique ou ovoïde, de diamètre généralement compris entre 0,8 et 1,2 μm , disposées en paires ou en chaînes dont la longueur varie selon l'espèce, la souche, ainsi que les conditions de culture. Cette formation en chaînes est particulièrement visible en culture liquide (Zhang et Cai, 2014 ; Gasmi et al., 2023). Certaines espèces comme *S. mutans* peuvent également apparaître sous forme de courts bâtonnets dans des conditions particulières, tandis que d'autres présentent une morphologie pléomorphe lors de l'isolement initial (Zhang et Cai, 2014). Ces bactéries sont anaérobies facultatives, avec une croissance optimale dans des conditions microaérophiles ou anaérobies, et leur culture sur milieux solides est facilitée par l'ajout de sang, de sérum ou de glucose. Sur gélose au sang, les réactions d'hémolyse varient en fonction de l'espèce et des conditions expérimentales. Certaines espèces de *Streptococcus* produisent des capsules composées soit d'acide hyaluronique, soit de polysaccharides capsulaires spécifiques, et peuvent également synthétiser des polysaccharides extracellulaires en présence de saccharose (Zhang et Cai, 2014). Les cellules de ce genre sont immobiles, incapables de croître à 15 °C mais capables de croissance à 45 °C. La majorité des souches survivent à un traitement thermique à 65 °C pendant 30 minutes, mais leur croissance est inhibée à un pH de 9,6 et en présence d'une concentration de 0,1 % de bleu de méthylène, cette dernière agissant comme agent antimicrobien. Leur croissance à 2 % de NaCl est variable, et aucune souche ne se développe à 3 %. Morphologiquement, il est difficile de les distinguer des genres proches tels que *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* (Gasmi et al., 2023).



Bryan Larsen

Figure 2 : *Streptococcus* sp., micrographie électronique à balayage. (Michael T. et al, 2021)

Pediococcus: Les *Pediococcus* sont des germes microaérophiles, à besoins nutritifs complexes, de nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles, leur fermentation homolactique conduit principalement à la production de L-acide lactique, bien que certaines espèces puissent

également produire du D-acide lactique, aboutissant parfois à un mélange racémique (DL-acide lactique).. Ils sont des Saprophytes et contaminent les produits végétaux. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Boudersa et Nena,2017**).

Lactococcus : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolés, en paires, ou Enchaines. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à Un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce Genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (**Gasmi et al, 2023**).

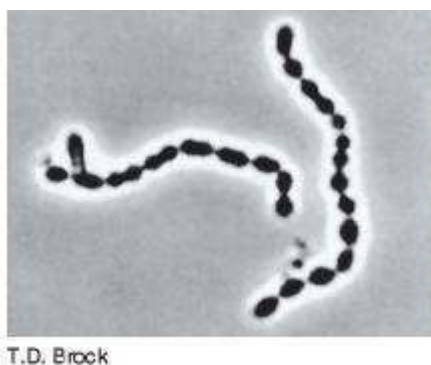


Figure 3 : *Lactococcus lactis*, micrographie en contraste de phase. (**Michael T. et al, 2021**)

Leuconostoc : a été défini par Van Thieghem en 1878. Ce genre a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de L'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Leur classification change au fur et à mesure avec la progression des connaissances, pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Selon **Hui et Evranuz (2016)**, Le genre *Leuconostoc* renferme 14 espèces (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc garlicum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc palmae* et *Leuconostoc miyukkimchii*). L'espèce *L. Mesenteroides* est la plus utilisée en agro-alimentaire, et renferme quatre sous-espèces (subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum*, subsp. *Cremoris*) et subsp. *Suionicum* qui a été ajoutée par **Gu et al., (2012)**, (**Bouricha,2020 , Ruppitsch et al., 2021**)

Oenococcus : Ce sont des bactéries immobiles, asporulées de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques, exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles poussant à un pH initial de 4,8. Elles ont pour Habitat le vin ; par conséquence, elles tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (Bjorkroth et Holzapfel, 2009 ; Demir et Belarbi, 2020).

1.4. Métabolisme des bactéries lactiques

1.4.1. Métabolisme des glucides

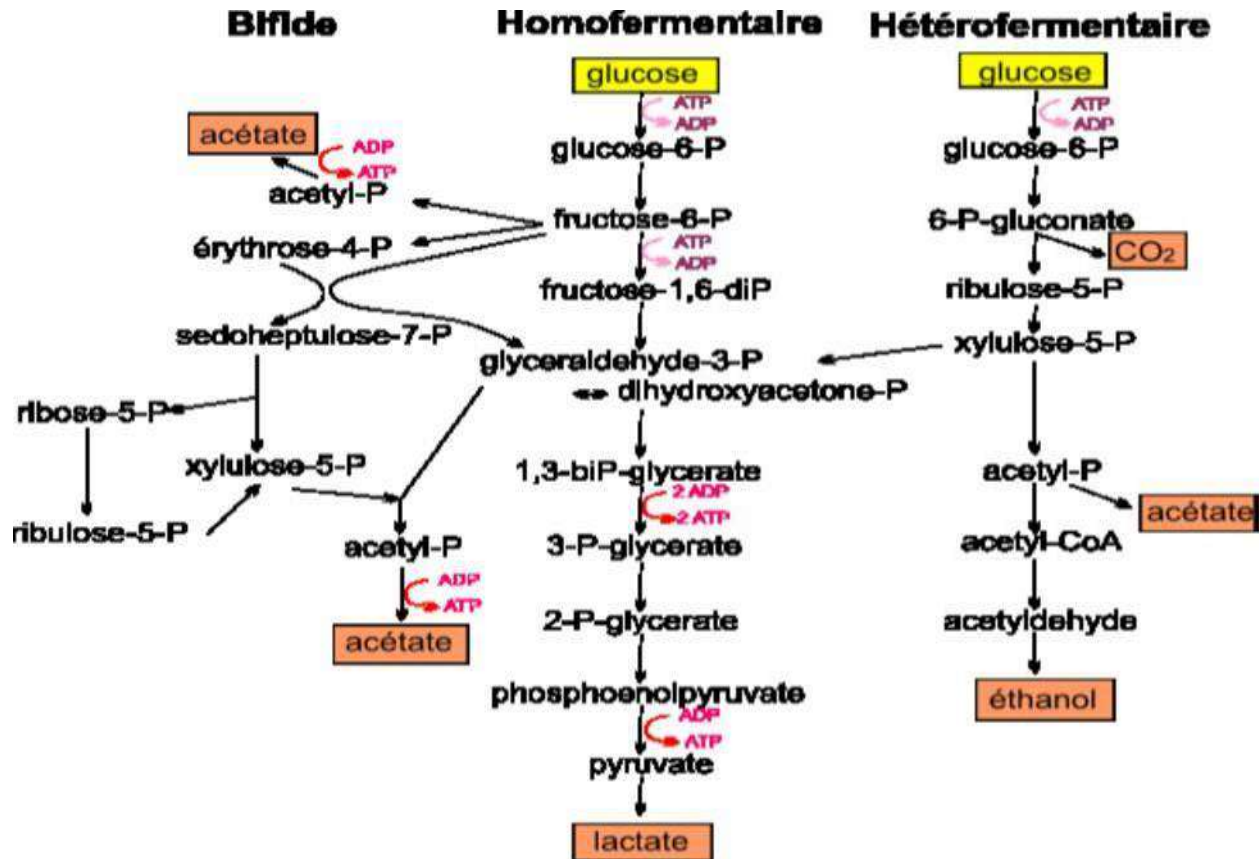
La fermentation des sucres par les bactéries lactiques aboutie principalement à la production d'ATP et d'acide lactique. En technologie laitier la principale fonction des bactéries lactiques est de transformer le lactose du lait en acide lactique qui intervient à différents stades des fabrications laitières (participe à la coagulation du lait, provoque la déminéralisation et l'égouttage du caillé et agit sur le goût et sur la conservation des produits laitiers fermentés) (Luquet, 1986). 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 (Luquet, 1986):

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme du lactose selon une voie homofermentaire donnant lieu à l'acide lactique comme unique produit de dégradation du glucose ;
- 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 homofermentaires et hétérofermentaires (voie des pentoses-phosphate.)

- **Voie homofermentaire ou EMP** : Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de Lactocoques, Pediocoques, ainsi que certains Lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).
- **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 (Thompson et Gentry Weeks, 1994).

FIGURE 4 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose (Dridier et Prevost, 2009).

1.4.2. Métabolisme du citrate

La concentration du citrate dans le lait est faible (environ 1,7 mg/ml) comparativement au lactose environ (49mg/ml). Mais il constitue une substance clef dans l'élaboration des produits laitiers fermentés. Dans la fermentation lactière, l'acide citrique est considéré comme le principal précurseur de la formation des composés aromatiques comme le diacétyl, l'acétoïne et l'acide acétique qui sont particulièrement recherchés et appréciés dans certains produits laitiers tels que les laits fermentés, le beurre, la crème fraîche et les fromages frais. Le citrate est aussi un précurseur dans la synthèse de composés cellulaires, il est impliqué indirectement dans la formation d'énergie, il permet aussi la production de CO₂ et la formation d'ouvertures dans les fromages (**Bourel et al., 2001**). Le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par une enzyme citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par le citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate qui est transformé en diacétyl par le biais d'une série de réactions intermédiaires (**Grattepanche, 2005**).

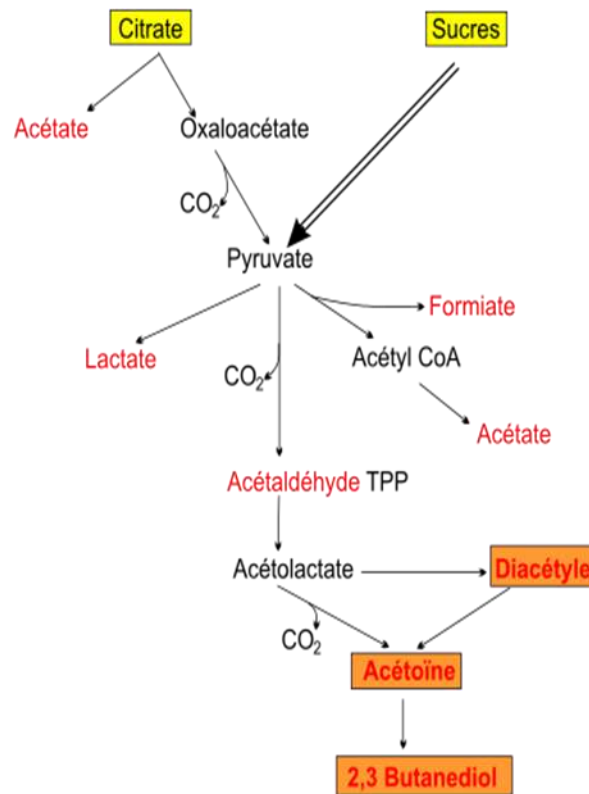


Figure 5 : Métabolisme du citrate (**Dridier et Prévost, 2009**)

1.4.3. Métabolisme des protéines

La protéolyse est le processus biochimique le plus important chez les bactéries lactiques, celle-ci confère aux aliments fermentés leur saveur et leur texture. La dégradation des caséines par les protéinases et les peptidases de la membrane cellulaire conduit à l'accumulation des petits peptides et des acides aminés libres. La conversion des acides aminés en alcools, aldéhydes, acides et des composés esters peut jouer un rôle aussi dans le développement des saveurs spécifiques (**Benmouna, 2019**). Trois grandes étapes peuvent être distinguées dans le processus de nutrition azotée : la protéolyse extracellulaire, le transport des acides aminés et des peptides dans la bactérie et la protéolyse intracellulaire. Les acides aminés présents dans le cytoplasme après transport et protéolyse vont être utilisés tels quels pour la synthèse protéique, où vont être catabolisés. Ce catabolisme va soit fournir de l'énergie à la bactérie soit aboutir dans certains cas, à la formation de molécules aromatiques (aldéhydes, acides, alcools) (**Kassas, 2017**).

1.4.4. Métabolisme des lipides

Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques. Cependant leur présence dans les fromages à des concentrations élevées pendant des périodes plus au moins importantes, peut les amener à libérer des quantités non négligeables d'acides gras libres (**karam et al, 2012**). L'hydrolyse des triglycérides est la transformation biochimique principale du gras fromager pendant la maturation et conduit à la formation des acides gras libres, mono et diglycérides et probablement du glycérol (**Siegumfeldt et al, 2000**). Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et Diglycérides, alors que les esters permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsable en partie de la saveur typiques des fromages à pâtes pressées cuites. L'augmentation de la concentration et de la disponibilité des substrats des estérases (alcool et acides gras) a permis d'améliorer la synthèse d'esters par plusieurs bactéries lactiques dans un système fromager modèle (**Fenster, 2003; Holland et al, 2005**).

1.5. Rôles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle central dans la fermentation des aliments, en particulier dans la transformation et la conservation des denrées périssables comme le lait, les

légumes et la viande. Leur métabolisme est caractérisé par la fermentation des glucides en acide lactique, ce qui entraîne une baisse du pH et limite la croissance de micro-organismes indésirables. Cette acidification naturelle constitue un moyen efficace de biopréservation. Dans de nombreux produits fermentés, les BL sont sélectionnées pour leur capacité à améliorer la stabilité microbiologique tout en apportant des arômes spécifiques, contribuant ainsi à la qualité organoleptique des aliments (**Bozoudi et al., 2021**).

Au-delà de leur fonction technologique, certaines souches, principalement du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont reconnues pour leur capacité à moduler le microbiote intestinal, à renforcer la réponse immunitaire et à améliorer l'absorption de certains nutriments. Ces effets bénéfiques sur la santé humaine justifient leur emploi dans les **aliments fonctionnels**, c'est-à-dire des aliments qui, au-delà de leur valeur nutritionnelle de base, apportent un effet bénéfique démontré sur une ou plusieurs fonctions de l'organisme et contribuent ainsi à améliorer la santé ou à réduire le risque de certaines maladies, et les formulations probiotiques. Les BL sont également capables de produire des substances antimicrobiennes, telles que les bactériocines, qui inhibent la croissance de pathogènes comme *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella spp.* (**Mozzi et al., 2015**).

Sur le plan industriel, les BL sont largement employées dans les fermentations contrôlées, notamment pour la production de fromages, yaourts, kéfir, charcuteries fermentées et légumes lactofermentés. Leur activité enzymatique contribue à la dégradation des protéines et des lipides durant la maturation, ce qui influence la texture, la flaveur et la digestibilité des produits finaux (**Holzappel & Wood, 2014**). Elles participent aussi à la production de composés bioactifs, comme des peptides à activité antihypertensive ou des polysaccharides exo-cellulaires, qui peuvent améliorer la texture ou la valeur fonctionnelle des aliments (**Mozzi et al., 2015**). L'optimisation des cultures de départ contenant des BL permet donc d'atteindre des standards élevés de qualité et de sécurité dans l'industrie agroalimentaire (**Holzappel & Wood, 2014**).

Chapitre II. Les ferments lactiques

2.1. Définition

Un ferment ou culture starter désigne un ensemble de micro-organismes, souvent sélectionnés, introduits volontairement dans un substrat pour initier une fermentation contrôlée. Ce processus biologique entraîne la transformation enzymatique de substrats organiques, généralement des sucres, en composés comme l'alcool, l'acide lactique ou l'acide acétique, permettant la conservation des aliments et la modification de leurs propriétés sensorielles (Zhang & Cai, 2014).

2.2. Principaux microorganismes fermentaires

2.2.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) constituent un groupe clé de micro-organismes utilisés dans les fermentations alimentaires pour leur capacité à convertir les glucides fermentescibles en acide lactique. Ce métabolisme anaérobie permet non seulement de prolonger la durée de conservation des aliments, mais aussi d'en améliorer la texture, la digestibilité et les caractéristiques organoleptiques. On distingue les espèces homofermentaires, comme *Lactococcus lactis* ou *Streptococcus thermophilus*, qui produisent exclusivement de l'acide lactique, et les espèces hétérofermentaires, comme *Leuconostoc mesenteroides* ou *Lactobacillus brevis*, qui génèrent également de l'éthanol, de l'acide acétique et du dioxyde de carbone. Ces ferments sont essentiels dans la fabrication de produits laitiers (yaourts, fromages), de légumes fermentés (choucroute, kimchi), de viandes séchées et de pains au levain (Zhang & Cai, 2014 ; Holzapfel & Wood, 2014 ; Kanauchi, 2019).

2.2.2. Les bactéries acétiques

Les bactéries acétiques, principalement du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter*, sont des micro-organismes aérobies qui transforment l'éthanol en acide acétique grâce à une oxydation incomplète. Cette activité biologique est à la base de la fabrication traditionnelle du vinaigre, mais aussi d'autres produits fermentés comme le **kombucha**, une boisson issue de la fermentation d'un thé sucré par une culture symbiotique de bactéries acétiques et de levures (SCOBY), où elles interviennent en synergie avec les levures. Leur tolérance à des conditions acides et leur capacité à survivre dans des milieux riches en oxygène leur confèrent un rôle spécifique et

complémentaire dans les fermentations mixtes.

Elles jouent également un rôle dans le développement de certains arômes caractéristiques de produits fermentés complexes (Holzapfel & Wood, 2014).

2.2.3. Les levures (ferments alcooliques)

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires, parmi lesquels *Saccharomyces cerevisiae* est l'espèce la plus emblématique. Utilisées dans les fermentations alcooliques, elles transforment les sucres simples (glucose, fructose) en éthanol et en dioxyde de carbone. Ce processus est fondamental dans la production de boissons alcoolisées telles que le vin, la bière et les spiritueux, ainsi que dans la panification, où le CO₂ produit permet la levée de la pâte. Certaines levures non-Saccharomyces, comme *Candida milleri*, sont aussi impliquées dans des fermentations spécifiques comme celles du levain. Par ailleurs, les levures participent aux fermentations mixtes, comme dans le kéfir ou le kombucha, en cohabitation avec les bactéries lactiques et acétiques (Zhang & Cai, 2014).

2.2.4. Les bactéries propioniques

Moins connues mais tout aussi importantes, les bactéries propioniques, en particulier *Propionibacterium freudenreichii*, jouent un rôle essentiel dans la fermentation secondaire de certains fromages à pâte cuite, comme l'emmental. Elles utilisent l'acide lactique produit par les BL comme substrat, le convertissant en acide propionique, acide acétique et CO₂. Ce processus est responsable des trous (ou "yeux") caractéristiques de ces fromages, ainsi que de leur goût légèrement noisetté. Au-delà de leur usage fromager, certaines souches sont également explorées pour leurs propriétés probiotiques et leurs effets potentiellement bénéfiques sur la santé intestinale (Kanauchi, 2019).

2.2.5. Les moisissures

Les moisissures utilisées en fermentation appartiennent principalement aux genres *Penicillium* et *Rhizopus*. *Penicillium camemberti* et *P. Roqueforti* sont essentiels à la production de fromages à croûte fleurie ou persillée, respectivement. Elles dégradent les lipides et protéines du lait, produisant des arômes complexes et contribuant à la texture crémeuse ou friable des fromages. *Rhizopus oligosporus*, quant à lui, est utilisé pour produire le tempeh à partir de graines de soja, grâce à sa capacité à hydrolyser les protéines végétales. Ces ferments fongiques nécessitent des

conditions spécifiques d'humidité et d'oxygène, et participent à des fermentations dites "solides", où peu ou pas d'eau libre est présente (Holzapfel & Wood, 2014).

2.3. Types de ferments lactiques

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

2.3.1. Selon la composition : selon la Fédération Internationale de Laiterie (1997), les ferments lactiques peuvent être classés en 3 catégories :

- **Les ferments purs** : constitués d'une souche d'une espèce bien caractérisée.
- **Les ferments mixtes** : ils sont formés d'un mélange de souches en nombres et en proportions indéfinis. Ils ont en général, une bonne activité acidifiante.
- **Les ferments mixtes sélectionnés** : contiennent plusieurs souches bien définies selon le cahier des charges de l'utilisateur.

2.3.2. Selon leur température de croissance : les ferments lactiques sont, selon les productions industrielles réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles (Wouters et al., 2002).

- **Ferments thermophiles** : Ils comprennent certains Lactobacilles, les Bifidobacterium et l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 40 °C et 50 °C. Les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Gruyère (Mayra-Makinen et Bigret, 2004 ; Carminati et al., 2010).
- **Ferments mésophiles** : Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris*) et des espèces aromatisantes (*L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroïdes subsp. cremoris*). 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. 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 (Carminati et al., 2010).

2.4. 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**).

2.4.1. 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**).

2.4.2. Aptitudes technologiques

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:

- 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.

(**Béal et al., 2008**)

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**). *L. lactis subsp. lactis*, *spp. 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**).

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**).

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**).

Aptitude aromatisant : Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3butanediol, 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**).

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.

Pouvoir antimicrobien : Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques par rapport à d'autres microorganismes est dû à la production de plusieurs métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂), le diacétyle et les bactériocines (**Labioui et al., 2005**). Cette propriété permettrait d'inhiber le développement des microorganismes indésirables et/ou pathogènes sans pour autant modifier les propriétés organoleptiques du produit. L'utilisation de souches lactiques inhibitrices comme cultures starters pour la bio préservation des aliments a fait l'objet de nombreuses études : en effet certaines souches de *Lactobacillus ssp.* ou encore de *Leuconostoc mesenteroides* sont capables d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* (**Ratti et al., 2010 ; Retureau et al., 2010 ; Pérez Ibarreche et al., 2014**). il a été démontré aussi que les croissances de *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* sont inhibées grâce à la production de bactériocines par une culture mixte de bactéries lactiques (**Càlix-Lara et al., 2014**).

2.5. Production de ferments lactiques

A l'échelle industrielle, les ferments sont produits sous forme de cocktail de souches ou de souche pure (le moins courant). L'objectif des fabricants de ferments est la production de microorganismes d'intérêts technologiques validés à des concentrations très élevées et avec des durées de conservation longues. La sélection des souches et la mise au point des conditions de production nécessitent un travail très important de recherche, de développement et d'essais pilotes.

Les ferments lactiques sont traditionnellement produits par fermentation discontinue appelée également fermentation « batch ». L'accumulation de produits toxiques, principalement l'acide lactique non dissocié et le lactate, est un facteur important limitant la production de levains lactiques par cette technologie. Les cultures en continu permettent d'éviter ce problème par l'emploi de taux de dilution adéquats mais présentent des risques importants de contamination et de perte d'activité enzymatique. D'autre part, en culture mixte, les interactions entre les souches peuvent conduire à l'élimination d'une ou plusieurs souches dans le bioréacteur. La fabrication en continu de ferments lactiques par des cellules immobilisées est prometteuse. En effet, cette technologie permet d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu, à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs et à la réutilisation des biocatalyseurs (**Doleyres, 2003**).

2.6. Rôle des ferments lactiques en fromagerie

Le fromage est défini comme un produit, fermenté ou non et affiné ou non (c'est-à-dire soumis ou non à un processus de maturation destiné à développer ses caractéristiques sensorielles), obtenu exclusivement à partir de matières d'origine laitières (lait partiellement ou totalement écrémé, babeurre) utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Jeantet et al., 2007**).

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 des associations de ferments très spécifiques de façon à avoir la cinétique d'acidification souhaitée (**Branger et al., 2007**).

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**). Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie appartiennent principalement à trois genres: *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* qui se différencient, entre autres, par leur activité acidifiante (**Hassan and Frank, 2001 ; Chamba, 2008**).

Partie
expérimentale

II. Matériel et Méthodes

2.1. Lieu du travail

L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de la faculté de science de la nature et de la vie à l'Université Kasdi Merbah Ouargla ainsi qu'au laboratoire de contrôle de la qualité CAQUE (Ouargla).

2.2. Matériels

○ 2.2.1 Appareils

- ❖ Autoclave (AL02-10),
- ❖ Plaque chauffante (velp scientifica),
- ❖ Four pasteur (Heraeus),
- ❖ Incubateurs (10°C, 30°C, 37°C et 45°C) (FALC),
- ❖ Bain marie (memmart),
- ❖ Réfrigérateur (Brandt).
- ❖ PH meter (Hanna ins)
- ❖ Microscope optique (Bioblue).
- ❖ Centrifugeuse (ALC4235)

○ 2.2.2 Milieux de culture :(annexe 01)

Milieu MRS (bouillon et gélosé), MRS-ev (sans extrait de viande), PCA, M17, MSE, GNO, M16 BCP.

○ 2.2.3 Petit matériel et réactifs :

Flacons en verre, tubes à essais, pipettes pasteurs, anse de platine, boîtes DE Pétri , H₂O₂, caséine, lait écrémé, tween 80, NaOH, NaCl, , glcérol, tubes eppendorff, extrait de levure , eau distillé, eau physiologique, Hcl, NaOH, burette, gamme du sucre (saccharose, lactose, maltose, fructose, arabinose, rhamnose, manitol), huile de parrafine, rouge de méthyle, plaque de ELISA, colorants pour la coloration du GRAM (rose de fuschine, violet de gentiane, alcool ,lugol), huile à l'immersion, lames en verres , reactif VP1et VP11, le phénol phtaléine .

2. 2.4 Matériel biologique

- **2.2.4.1 Les végétaux**

Les végétaux utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques sont : les tomates, trois variétés différentes de dattes (Deglet Nour, Mech Degla, Ghers), des cornichons, du poivron, des oranges et des olives. Le choix des végétaux se fait en se basant sur leur richesse naturelle en sucre et pH légèrement acide qui constituent des conditions favorables naturellement présentes sur leurs surfaces.

- **2.2.4.2 Le lait bovin**

Le lait bovin cru est utilisé pour la production du fromage frais, l'échantillon a été collecté le 31/05/2025 dans la ferme de ABDESSAMAD de la wilaya d'Ouargla, la région de HASSI-ABDALLAH . il est recueilli dans des flacons stériles en verre puis acheminés au laboratoire dans des glacières à température de 4°C.

- **2.4.3 Les souches pathogènes**

Les souches pathogènes utilisés pour tester l'activité antimicrobiennes des souches lactiques étudiées s'agit de deux souches pathogènes : une souche de **Staphylococcus aureus** (bactérie à Gram positif) et une souche de **Escherichia coli** (bactérie à Gram négatif). Ces isolats cliniques ont été pré-identifiés dans les laboratoires médicaux Al-Amel et El-Manar, en l'absence de souches de référence codées (ATCC ou CIP).

2. 3. Méthodes

2.3.1. Isolement des bactéries lactiques

Afin d'isoler les bactéries lactiques, les végétaux utilisés ont été écrasés séparément dans un mortier préalablement stérilisé par autoclavage pendant 1 à 2 minutes. Par la suite 1ml du brouillât obtenu est ajoutée à 9 ml du bouillon MRS. La culture est ensuite incubée à 37°C pendant 24 à 48 h. Les cultures ainsi obtenues sont par la suite transférées sur gélose MRS.

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS préalablement coulées et solidifiées dans des boîtes de Pétri, en portant quelques gouttes de culture végétal (0.1 ml) à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h; après incubation, les colonies obtenues ont été sélectionnées après analyse macroscopique, coloration de Gram et test de catalase. Seules les colonies qui présentent un aspect typique des colonies de bactéries lactiques, et qui sont Gram

+ et catalase -, ont été prises en considération et ont servi pour le repiquage des tubes contenant le bouillon MRS afin d'entamer leur purification par la suite.

2.3.2. Purification des souches lactiques

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages alternés et successifs sur milieux MRS (bouillon /gélose) jusqu'à l'obtention de colonies bien séparées. Les bactéries lactiques sont généralement Gram positif, catalase négative et anaérobies aérotolérantes. Elles tolèrent des conditions de croissance variables selon l'espèce, notamment la salinité et la température (Axelsson, 2004 ; Gasmi et al., 2023).

2.3.3. Conservation des isolats

Les bactéries lactiques sélectionnées sont conservées, deux méthodes de conservation ont été utilisées:

Courte durée : Les souches sontensemencées sur gélose MRS inclinée et incubé à 30°C. Après l'apparition des colonies, les cultures ont été conservées à une température de 4°C (Badis et al., 2005).

Longue durée : A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol). Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorff à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi et al., 2004).

2.3.4. Pré-Identification des souches lactiques

La pré-identification des souches lactiques est basée sur la détermination de leurs caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques.

2.3.4.1. Examen macroscopique : Cet examen permet l'observation visuelle de la culture des isolats lactiques sur milieu (MRS) solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis et al., 2005).

2.3.4.2. Examen microscopique : Ce test est effectué sur des frottis auparavant colorés (coloration de Gram), qui permet de sélectionner les bactéries Gram+ et Gram-, et d'apprécier la forme et le mode de regroupement des cellules. La coloration est faite selon la méthode classique (Annexe 01), L'observation des cellules bactériennes est réalisée au microscope optique (G x100) (Guiraud et Galzy, 1980).

2.3.4.3. Recherche de la catalase : La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Sur une lame propre, déposer une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) puis ajouter une colonie bactérienne, une catalase positive est indiquée par le dégagement de bulles de gaz (**Delarras, 2014**).

2.3.4.4. Tests Physiologiques

Croissance a différentes températures : Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Chaque souche est inoculée dans le bouillon MRS et incubée a différents les températures : 10°C pendant 7 à 10 jours, 37°C et 45°C pendant 24-48 heures (**Abada et Letrach, 2022**).

Test de la thermorésistante : Des cultures jeunes de 18h sur le bouillon MRS sont ~~soumises~~ à bain Marie à 60-70°C pour 30 minutes. Après refroidissement, les tubes sont incubés à température de 37°C pour 48h. (**Larbi et Mehifer, 2023**). Ce test vise à identifier les souches capables de résister à des températures élevées, un critère important pour leur sélection comme ferments potentiels dans des procédés de transformation soumis à un stress thermique (**Mozzi et al., 2011; Holzapfel & Wood, 2014**).

Croissance à 6.5 % de NaCl : Ce test permet de vérifier la capacité des bactéries à croître dans un milieu hyper. Les souches bactériennes sont ensemencées dans le bouillon MRS à concentration de 6,5% de NaCl, puis incubés à 37°C et 30°C pendant 24h. Les résultats positifs se traduisent par un trouble (**Abada et Letrach, 2022**).

Croissance à pH 9.6 : La croissance des isolats lactiques est testée à pH 9.6. Les colonirs bactériennes sont ajoutées au bouillon MRS à pH indiqué puis incubées à 30°C pendant 24 heures (**Mohammed et Homci, 2024**). Ce test permet d'évaluer la capacité des souches à tolérer des conditions alcalines, ce qui reflète leur stabilité physiologique et leur potentiel d'adaptation à des environnements variées (**Zhang & Cai, 2014**).

Type fermentaire : ce test est effectué pour distinguer les bactéries lactiques homofermentaires des bactéries lactiques hétérofermentaires. Il consiste à repiquer une colonie donnée dans un tube à essai contenant 5ml de bouillon MRS + une cloche de Durham puis incubation à 30 ou 37°C

(Larbi et Mehifer, 2023). Le gaz est formé dans la cloche en cas du développement d'une souche hétérofermentaire (Ramal et Ouessai, 2020 ; Gasmi et al, 2023).

Hydrolase de l'arginine : L'arginine déshydrogénase (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en produisant l'ammoniac et des amines (composés basiques) (Hansal, 2015). Les souches lactiques sont ensemencées sur milieu M16 BCP, puis incubées à 30°C pendant 24h . Le virage du milieu vers le jaune indique l'absence d'hydrolyse de l'arginine, tandis qu'un changement vers le violet (pourpre) traduit une hydrolyse positive (Boumediene, 2013).

Test de lait bleu de Sherman : Cette épreuve a pour but d'étudier l'aptitude des bactéries lactiques à pousser en présence de 1% et 3% du bleu de méthylène ainsi que leur capacité à le réduire. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer (Bekhouché, 2006). Il consiste à ensemencer des tubes à essai contenant 10ml de lait écrémé additionné de 1% ou 3% de bleu de méthylène , une colonie lactique est ensemencé à l'aide d'une pipette Pasteur ou anse de platine . les tubes sont incubées pendant 24 à 48 h à température du 30 ou 37°C . La croissance des souche lactique se traduit par la décoloration du lait.

2.3.4.5. Étude du profil fermentaire des sucres : Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches lactiques à métaboliser divers substrats carbonés, en particulier les sucres. Ce test est réalisé en ensemencant des plaques ELISA contenant du bouillon MRS sans extrait de viande (Leveau *et al.*, 1991), additionné d'un indicateur de pH (rouge de méthyle à 0,04 g/l). Le glucose du milieu MRS est remplacé par le sucre à tester à une concentration finale de 0,3 % (les solutions de sucres utilisées : mannitol, fructose, lactose, saccharose, arabinose, rhamnose, maltose), avec 0,1 ml de culture et l'ajout d'une fine couche d'huile de paraffine stérilisée pour assurer l'anaérobiose (Samelis *et al.*, 1994). La solution bactérienne utilisée pour l'ensemencement est préparée à partir d'une culture de 18 heures, centrifugée à 4000 tr/min pendant 10 minutes, lavée avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les résidus du milieu, puis remise en suspension dans le bouillon MRS modifié. Chaque puits reçoit 100 µl de cette suspension. Après incubation pendant 48 à 72 heures, la croissance bactérienne accompagnée du changement de couleur de l'indicateur (rouge de méthyle), consécutif à l'acidification du milieu, traduit la fermentation du sucre testé. (Guessas et Kihal, 2004).

2.4. Etude de l'Aptitude technologique des souches lactiques

2.4.1. L'activité acidifiante

Pour déterminer l'activité acidifiante de nos isolats lactiques, une solution de lait écrémé reconstitué à 10 % (p/v) a été préparée. Chaque flacon contenant 100 ml de lait stérile a étéensemencé avec 1 ml d'une culture lactique jeune (incubée pendant 18 h à 30 °C ou 37 °C selon la souche). L'incubation a été réalisée à 37 °C, avec des prélèvements effectués après 2h, 4h, 6h et 24h. Le pH a été mesuré également à l'aide d'un pH-mètre étalonné, alors que l'acidité titrable a été déterminée sur 10ml d'échantillon à l'aide d'une solution de soude (NaOH N/9), en présence de deux gouttes de phénolphthaléine comme indicateur (**Gasmi et al., 2023**). L'acidité est calculée selon la formule suivante : $\text{Acidité (°D)} = V(\text{NaOH}) \times 10$

2.4.2 Activité protéolytique

Les cultures lactiques jeunes ont été inoculées par touches sur gélose MRS additionnée du lait écrémé à 10% et incubées à 30°C. La formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes confirme la capacité des souches à décomposer la caséine du lait (**Mohammed et Homci, 2024**).

2.4.3 Activité texturante

La capacité des souches lactiques isolées à produire des exo-polysaccharides (EPS) a été évaluée en analysant leur texture et leur potentiel épaississant, permettant ainsi d'étudier leurs propriétés rhéologiques (c'est-à-dire leur influence sur la viscosité, la consistance et la texture des matrices alimentaires) et leurs applications possibles. Les cultures lactiques ont étéensemencées par stries sur milieu MSE et incubées à 30°C. La production d'EPS a été vérifiée par l'apparition des colonies visqueuses de grande taille, ce qui illustre leur capacité à produire ces composés polysaccharidiques (**Mohammed et Homci., 2023**).

2.4.4 Activité lipolytique

La lipolyse des souches lactiques est mise en évidence sur gélose MRS supplémentée en **Tween 80 (2 % v/v)**, le milieu est coulé sur des boîtes pétri puisensemencé par touche à partir des cultures lactiques jeunes (de 18 heures) et incubés pendant 48h à 30°C. Un halo clair se forme autour des colonies indique le résultat positive de l'activité lipolytique (**Guiraud et Galzy.1980**)

2.4.5. Activité aromatisante

Ce test a pour objectif de détecter la production d'intermédiaires aromatiques comme l'acétoïne, indicateurs du potentiel des souches à enrichir le profil sensoriel des produits fermentés (**Holzappel & Wood, 2014**). La production d'acétoïne (acétylméthylcarbinol) est testée par la réaction de Voges-Proskauer (VP), en utilisant le milieu de Clark et Lubs. Une colonie isolée est incubée dans ce milieu pendant 24 heures à 30 °C. Après incubation, 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude à 16 % dans l'eau distillée) et 5 gouttes du réactif VP2 (α -naphтол à 6 % dans l'alcool absolu) sont ajoutées. Les tubes sont ensuite agités délicatement, puis laissés au repos pendant 10 minutes à température ambiante. L'apparition d'un anneau rose ou rouge à la surface du milieu indique un test V.P. positif, révélant l'utilisation de la voie butylène glycolique pour la fermentation des hexoses.

2.4.6. Pouvoir anti-microbien

Les souches lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par des disques, décrite par **Hamadan & Mikolajcik (1974)** ; **Apella, Gonzalez, Nader de Macias, Romero & Oliver (1992)** ; **Tadesse et al., (2004)**. Elle consiste à déposer des disques vierges imprégnés des souches lactiques en bouillon, à la surface des boîtes de Petri préalablement inoculées par les souches cibles qui sont de gram + (*staphylococcus aureus*) et gram - (*Escherichia coli*) et ont été utilisés en l'absence de souches de référence codées (ATCC). Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'inhibition se manifeste par la présence de zones claires autour d'un trouble formé par la croissance des souches cibles. Le diamètre de la zone d'inhibition est calculé à partir des bordures de la zone comprenant le diamètre du disque (6mm). L'inhibition est considérée positive lorsque le diamètre de la zone est supérieur à 1mm selon **Schillinger et Lucke, (1989)** ; **Allouche et al., (2010)**.

2.4.7. Etude du pouvoir antagoniste des souches lactiques

Ce test a pour objectif de vérifier la compatibilité entre les souches en vue de leur utilisation combinée dans une culture fermentaire. La présence d'interactions inhibitrices indique que les souches ne peuvent pas être associées dans un même ferment.

Le pouvoir antagoniste des souches lactiques a été étudié en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Une suspension bactérienne préparée à partir d'une colonie isolée dans 1 ml d'eau physiologique est déposée à la surface du milieu MRS solide, puis étalée sur la surface du milieu PCA gélifié par un mouvement en forme de huit (∞) afin d'assurer une répartition homogène.

Après quelques instants, l'excès de suspension est retiré, ne laissant qu'un film bactérien à la surface. Des disques stériles, imprégnés de cultures d'autres souches lactiques sélectionnées, sont ensuite placées à la surface du milieu. Après incubation, la présence d'une zone d'inhibition autour des disques traduit une interaction antagoniste.

2.5. Essai de Fabrication de fromage frais par les ferments lactiques sélectionnés

Le fromage frais est un produit laitier non affiné obtenu par coagulation des protéines du lait, généralement à l'aide d'une acidification directe (acide citrique, vinaigre) ou par fermentation lactique. Contrairement aux fromages affinés, il ne subit pas de maturation, ce qui lui confère une texture souple à pâte molle, une forte teneur en humidité et une saveur douce légèrement acidulée. Il est habituellement de couleur blanche, à durée de conservation courte, et doit être consommé rapidement après sa fabrication. Des exemples typiques incluent le fromage blanc, la ricotta, le queso fresco, ou encore le jben traditionnel algérien (**Karlin, 2011 ; Hutkins, 2019**).

3.5.1. Choix du ferment lactique

Les ferments sont sélectionnés en se basant sur leur pouvoir acidifiant ainsi que sur le résultat de test d'antagonisme entre les souches lactiques.

3.5.2. Technique de production (figure 07)

La technique de production du fromage frais adoptées est inspirée par des travaux de plusieurs auteurs tel que : **Meghoufel (2019), Mezarja (2018) et Amimour (2019)**.

Préparation du levain : Une culture jeune ~~dans un~~ bouillon MRS incubée à 30 °C est réalisée pour chaque souche lactique choisi ; Dans 200 ml de lait écrémé stérile, les souches lactiques ont étéensemencées séparément à raison de 5 % (v/v) de culture jeune. Les laits inoculés sont incubés à 30°C pendant 24 h.

Préparation du fromage :

- Le Lait bovin recueilli est pasteurisé à 80 °C pendant 20 min ;
- Le lait pasteurisé est ~~laissé à~~ refroidi quelques heures avant son utilisation afin de permettre une meilleure homogénéisation avec le levain ajouté ; Le lait est maintenu au bain Marie à 30 °C, avec une légère agitation. Le levain est incorporé dans le lait à raison de 5 % en trois échantillons :
 - 1 : 100ml de levain de la souche 01 + 2 litres de lait.
 - 2 : 100ml de levain de la souche 02 + 2 litres de lait.

- 3 : 50 ml de levain de la souche 01+ (50ml) de levain de la souche 02 + 2 litres de lait.

Le lait est incubé à 30 °C pendant 24 à 48 h, jusqu'à la coagulation. Après celle-ci, le caillé formé est chauffé à 42 °C pendant quelques secondes afin de **favoriser la séparation du lactosérum**. L'égouttage est ensuite réalisé à l'aide d'une passoire pendant quelques minutes, ce qui permet de conserver une teneur élevée en humidité dans le fromage frais.

Les fromages ainsi obtenus sont mis dans des boîtes et laissées au réfrigérateur pendant 24h pour maturité.

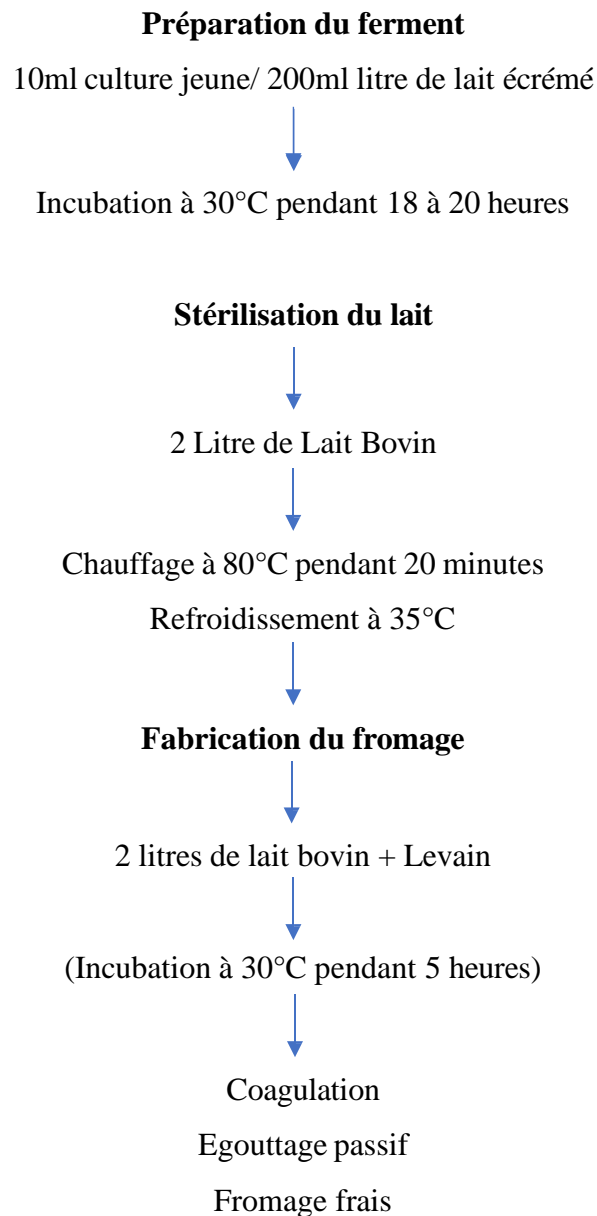


Figure 6 : Etapes suivies pour la fabrication de fromage frais

2.6. Analyse sensorielle du fromage produit

Les trois échantillons de fromage ont été soumis à une analyse sensorielle réalisée par un panel de 20 personnes. Chaque dégustateur a reçu une fiche d'évaluation comportant plusieurs critères organoleptiques : l'aspect visuel, l'odeur, la saveur, l'arrière-goût ainsi que la préférence globale. Les participants ont été invités à déguster les fromages et à exprimer leur appréciation selon ces différents paramètres (voir annexe 04)

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion :

3.1. Isolement et purification des bactéries lactiques :

L'isolement des bactéries lactiques à partir des échantillons d'origine végétale (cornichons, olives, piments, dattes, oranges) nous a permis d'obtenir une diversité morphologique notable sur le milieu de culture MRS.



Figure 7 : Aspect des cultures lactiques sur MRS liquide

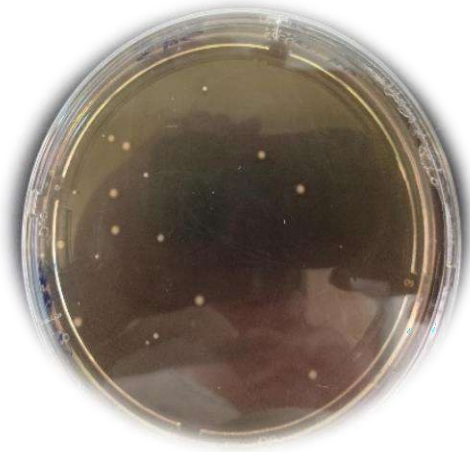


Figure 8 : Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques sur MRS

Parmi les 108 isolats soumis aux tests de Gram et de catalase, 43 souches ont été identifiées comme bactéries lactiques (Gram positif, catalase négatif), conformément aux critères classiques d'identification des LAB (Zhang & Cai, 2014 ; Hammi Terras, 2019).

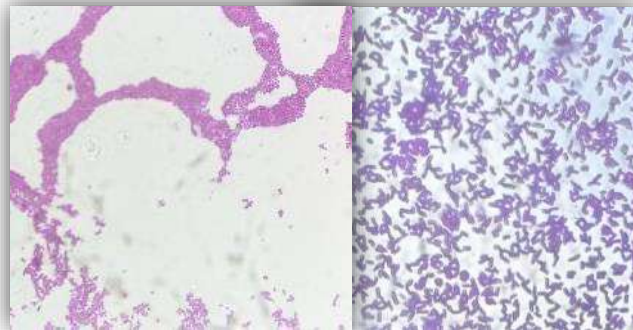


Figure 9 : Les résultats de coloration de Gram montrant un isolat Gram – (rose, gauche) et un isolat Gram + (violet, droite)

L'isolement des bactéries lactiques à partir des matrices végétales (dattes, olives, piments, oranges) a permis d'obtenir une grande diversité de colonies sur MRS e, présentant des morphologies variées : visqueuses, sèches, opaques ou de type levure. Cette diversité reflète la richesse microbienne propre aux fermentations spontanées végétales où cohabitent bactéries lactiques, levures et autres micro-organismes (Endo et al., 2019 ; Mezarja, 2019 ; Pote, 2014).

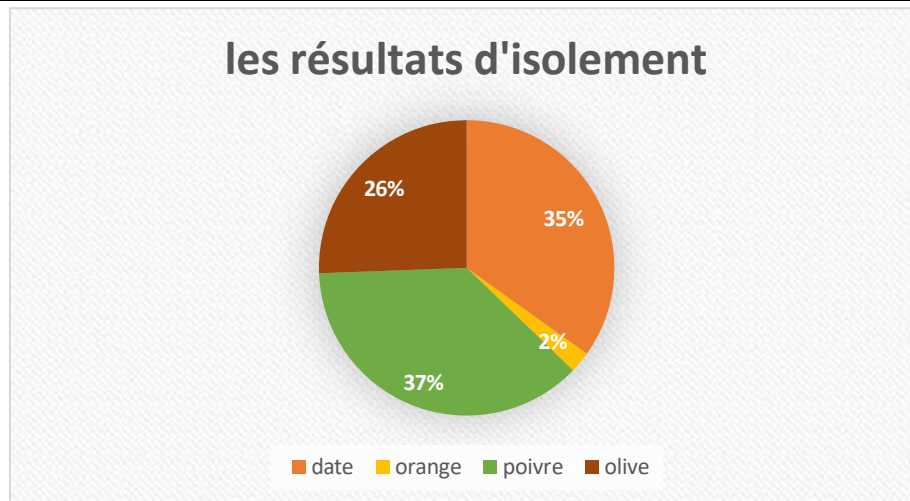


Figure 10 : Proportions des souches lactiques isolées à partir des différents échantillons végétaux.

Selon la figure 10, la grande partie des isolats lactiques est issue de poivre et des dattes avec des pourcentages de 37% et 35% respectivement, puis les olives avec un pourcentage modéré 25% et en fin 2% des isolats sont isolées à partir de l'orange.

Une perte progressive de viabilité a été constatée lors des repiquages et des essais technologiques, réduisant le nombre de souches exploitables à 25 souches seulement. Ces pertes sont fréquentes chez les LAB d'origine végétale, souvent adaptées à des niches écologiques spécifiques et dépendantes de conditions propres à leur environnement naturel (Mezarja, 2019 ; Pote, 2014 ; Zhang & Cai, 2014). En conditions de culture standardisées, certaines de ces souches ne parviennent pas à se maintenir durablement. Ainsi, une collection stable de 25 souches a été constituée pour les étapes ultérieures de caractérisation phénotypique et technologique.

3.2. Identification des isolats lactiques

3.2.1. Croissance aux différentes températures

La croissance à différentes températures a révélé que la majorité des souches étaient mésophile, avec une croissance à 45 °C pour la plupart des isolats issus des dattes (D01, D02, D03, etc.) et de l'orange (OR01). En revanche, très peu de souches ont montré une croissance à 10 °C, indiquant une faible adaptation aux conditions psychrophiles. Ces résultats rejoignent ceux de Mozzi et al. (2011), qui indiquent que les BL issues des végétaux tropicales sont souvent mésophiles à thermotolérantes.

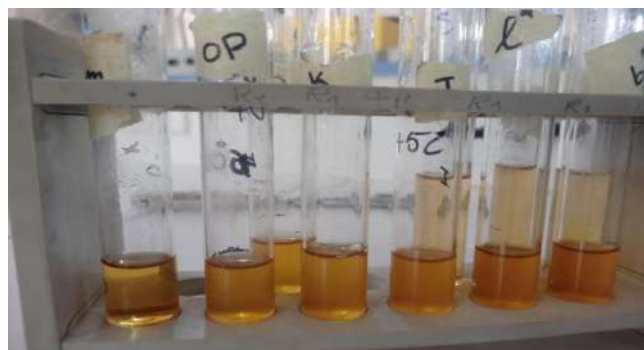


Figure 11 : Résultats la croissance des bactéries à 45°C.

3.2.2 Croissance aux 6.5% de NaCl

Concernant la tolérance au sel, seules quelques souches, principalement issues des dattes et des olives, ont montré une croissance en présence de NaCl à 6,5 %, ce qui est une caractéristique généralement associée aux genres *Enterococcus* ou *Lactobacillus plantarum* (Zhang & Cai, 2014). La majorité des isolats de poivre et d'oranges n'ont pas supporté cette concentration saline.

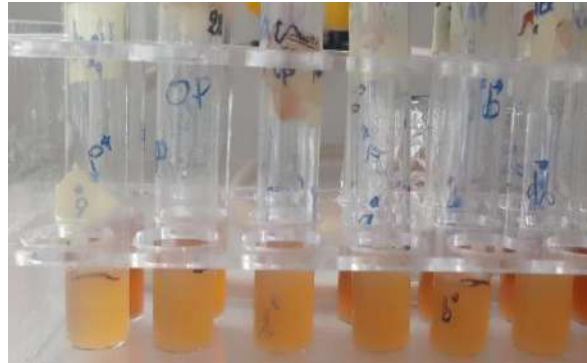


Figure 12 : Résultat positif de la croissance à 6.5% de NaCl

3.2.3 Croissance au pH 9.6

Le test de croissance à pH 9,6 a montré des résultats similaires, avec très peu de souches capables de croître dans un milieu alcalin. Cela reflète la préférence acidophile classique des BL, et ce comportement est confirmé dans la littérature (Bouricha, 2022 ; Demir & Belarbi, 2020).



Figure 13 : Résultat de la croissance en pH 9.6

3.2.4 Test de thermorésistante (choc thermique à 60°C)

Afin d'évaluer la capacité des souches à résister à un stress thermique, un traitement thermique à 60°C pendant 30 minutes au bain-Marie a été appliqué sur des cultures jeunes. Après incubation ultérieure à 37°C pendant 24 h, la majorité des souches ont montré une reprise de croissance effective, traduisant une bonne résistance au choc thermique. Les souches des dattes (D01, D02, D03, D04, D05, D06, D07), de l'orange (OR1) ainsi que plusieurs souches issues des olives (V01 à V06) ont particulièrement bien toléré le traitement, tandis que certaines souches de piments (P09,

P10, P11) ont montré une sensibilité accrue. La tolérance à un tel stress thermique est un indicateur important de la viabilité technologique des souches, notamment pour les procédés où les ferments doivent résister à des étapes de pasteurisation partielle ou à des variations de température avant ensemencement industriel (Mozzi et al., 2011 ; Holzapfel & Wood, 2014). Selon Mezarja (2019), les souches lactiques végétales qui résistent à ce type de traitement possèdent souvent des systèmes efficaces de protection des protéines, notamment les chaperonnes, comme les protéines de choc thermique (HSP).



Figure 14 : Résultat du test de la thermorésistance

3.2.5 Type fermentaire

Les résultats ont montré que la grande majorité des souches isolées présentaient un métabolisme **homofermentaire**, ne produisant pas de gaz visible dans les tubes Durham. Cette homogénéité métabolique concerne notamment les souches issues des dattes (D01, D02, D03, D04, D05, D06, D07), de l'orange (OR1), et des poivres (P01,P02,P03,P04,P05,P06,P07,P08), ainsi que des olives (V01,V02,V03,V04,V05, V06).

Seules les souches provenant des extraits de poivre (*P09, P10, P11*) et quelques d'autres isolées à partir des dates (mais cessé de croître) ont montré une production nette de gaz, indiquant un métabolisme **hétérofermentaire**. Ce profil est cohérent avec la nature de ces souches, potentiellement affiliées aux genres *Leuconostoc* ou *Weissella*, fréquemment rencontrés dans les matrices végétales fermentées et caractérisés par leur activité hétérofermentaire stricte ou facultative (Alameri, 2022 ; Bouricha, 2022).

La prédominance du métabolisme homofermentaire parmi la majorité des isolats est favorable pour une application fromagère, car elle permet une production d'acide lactique plus rapide et stable, essentielle pour la coagulation du lait et la stabilisation du produit (Mozzi et al., 2011).



Figure 15 : Résultat du type fermentaire.

3.2.6 Hydrolyse d'arginine

Concernant le test d'hydrolyse de l'arginine, les résultats indiquent que les souches issues des dattes et de l'orange sont positives, ce qui est souvent associé à des genres comme *Lactobacillus*, *Enterococcus* ou *Weissella* (Mozzi et al., 2011). En revanche, les souches issues des poivres (P1–P8) ainsi que la souche V4 sont négatives, tandis que celles issues d'olive ou du poivre n'ont pas pu être testées (absence de croissance en milieu M16), ce qui empêche leur interprétation.



Figure 16 : Résultat de l'ADH

3.2.7 Test de lait de Sherman

Le test de lait bleu de Sherman, utilisé pour évaluer la capacité acidifiante en présence de méthylène bleu (1 % et 3 %), a révélé une activité faible chez la majorité des souches. Seules certaines souches d'olives (V01, V02, V03, V04, V05, V06) et de poivre (P09, P10, P11) ont montré une coagulation du lait sans décoloration. Indiquant une activité acidifiante rapide, corrélée à leur utilisation potentielle comme ferments (Mezarja, 2019).



Figure 17 : Résultat positive du test de lait bleu de Sherman

3.2.8. Fermentation des sucres

La fermentation des sucres simples (mannitol, fructose, lactose, saccharose, arabinose, rhamnose, maltose) a montré des résultats globalement faibles. Les milieux contenant uniquement ces sucres ont majoritairement conservé une coloration jaune avec le rouge de méthyle, traduisant une absence de forte acidification.

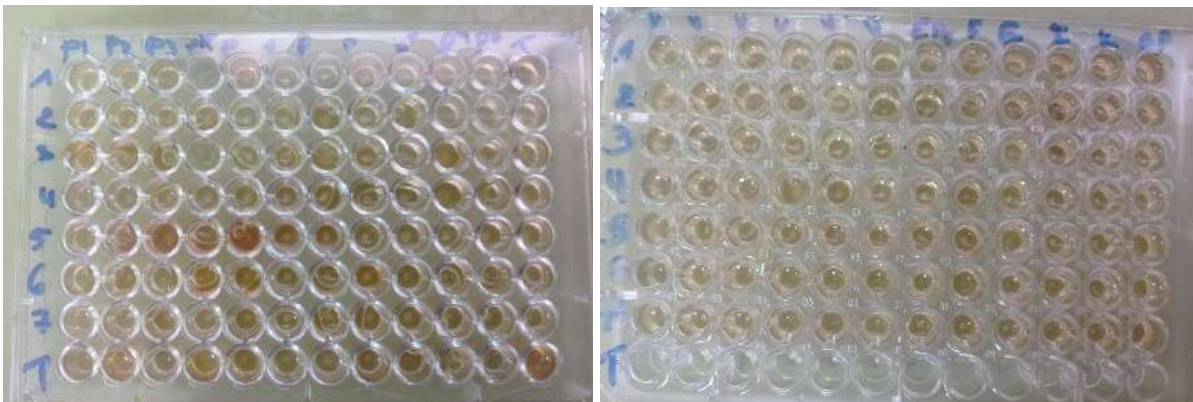


Figure 18 : Résultats de la fermentation des sucres après 48h

L'ensemble des résultats de pré-identification des isolats lactiques est récapitulé dans le tableau si-dessous (**tableau 1**) :

Tableau 01 : Résultats des tests de pré-identification des souches lactiques

souches	Source	Form macro	Form micro	Gram	Catalase	Type Fermentat	Thermoresist	6.5% NaCl	croissance a pH 9.6	Croissance 10°C	Croissance 45°C	Hydrolase d' arginine	Test de lait de sherman	Test de lait de sherman	Possible genre
													1%	3%	
D01	Date	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	homo	+	-	-	+	+	+	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
D02	Date	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	+	-	-	+	+	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
D03	Date	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	homo	+	+	-	-	+	+	-	/	<i>Enterococcus sp.</i>
D04	Date	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	homo	+	-	-	-	+	+	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
D05	date	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	homo	+	+	-	-	+	+	-	/	<i>Enterococcus sp.</i>
D06	date	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	homo	+	+	-	-	+	+	-	/	<i>Enterococcus sp.</i>
D07	date	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	-	+	+	-	/	<i>Weissella sp.</i>
OR01	Orange	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	-	+	+	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
V01	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	+	-	-	-	+	/	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>
V02	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	-	-	-	-	+	/	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>
V03	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	-	+	-	-	-	/	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>
V04	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	+	-	-	-	+	-	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>

V05	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	+	-	-	-	+	/	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>
V06	olive	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	homo	+	-	-	-	+	/	+	+	<i>Lactobacillus sp.</i>
P01	poivre	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
P02	poivre	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactobacillus sp.</i>
P03	poivre	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
P04	poivre	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactobacillus</i>
P05	poivre	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactobacillus sp.</i>
P06	poivre	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	Homo	+	-	+	-	-	-	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
P07	poivre	Blanche, visqueuse	bacilles	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactobacillus sp.</i>
P08	poivre	Blanche, visqueuse	coccus	+	-	Homo	+	-	-	+	-	-	-	/	<i>Lactococcus sp.</i>
P09	poivre	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	Hetero	+	-	-	-	-	/	+	+	<i>Weissella sp.</i>
P10	poivre	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	Hetero	-	-	-	-	-	/	+	+	<i>Weissella sp.</i>
P11	poivre	Blanche, sèche, très petit	coccus	+	-	Hetero	+	-	+	-	-	/	+	+	<i>Weissella sp.</i>

3.3 Aptitude Technologique des isolats lactiques

3.3.1 Activité acidifiante

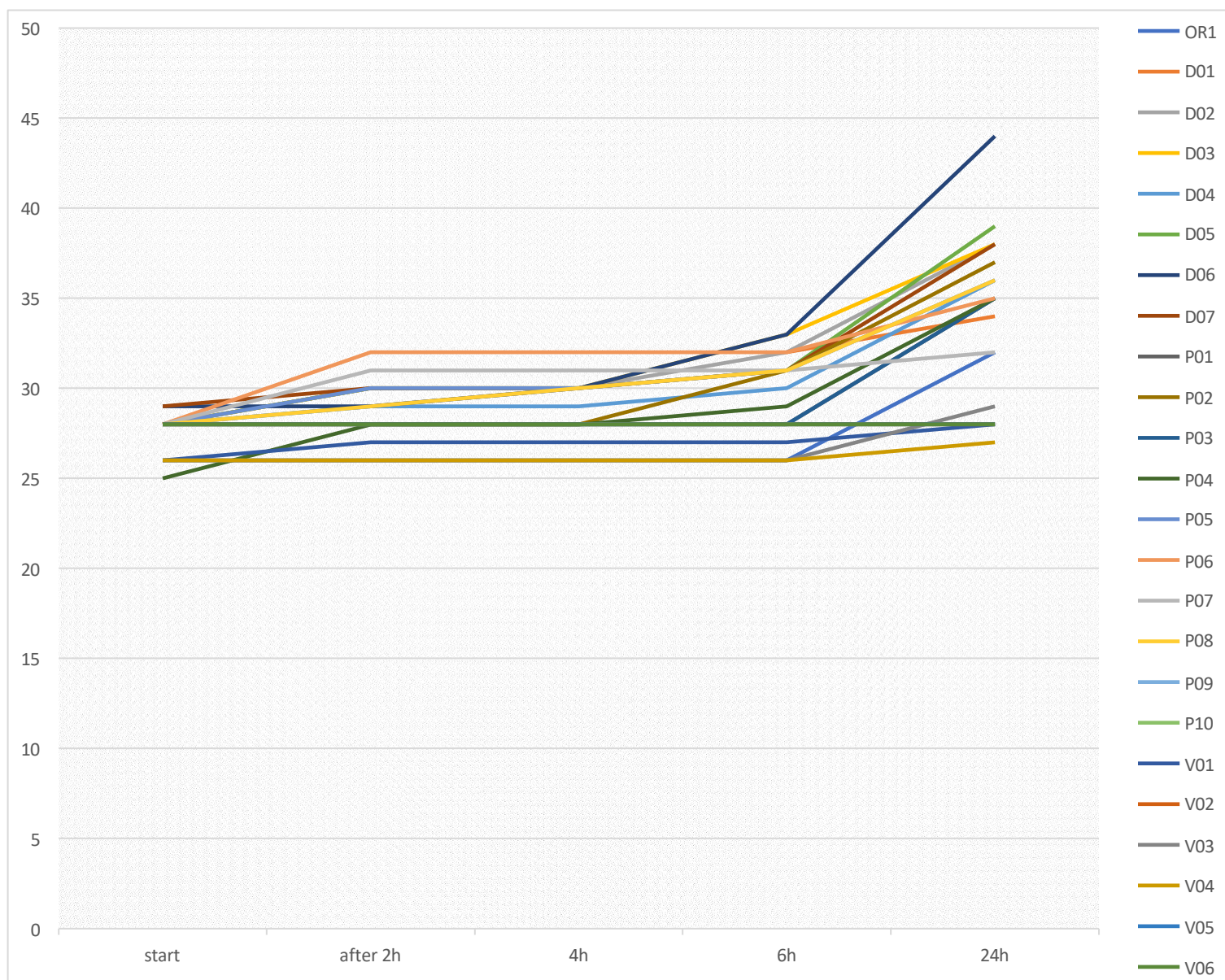


Figure 19 : Évolution de la production d'acide lactique en fonction du temps

L'activité acidifiante des différentes souches lactiques a été évaluée après incubation en milieu liquide à base de lait écrémé stérile pendant 24 heures à 37 °C, en mesurant l'acidité titrable (°D) (**figure 19**) et la variation de pH (**figure 20**). Les résultats ont montré une variabilité importante entre les souches :

Les souches issues des dattes (Enterocoque et lactocoques) ont présenté une forte acidification, avec des pH finaux inférieurs à 5.7 et des valeurs d'acidité supérieures à 38 °D. Ces souches présentent ainsi un fort potentiel pour la fermentation lactique classique.

Les souches issues des piments (Lactobacilles et Lactocoques) ont montré une acidification modérée, avec des pH autour de 5.9 à 6.0 et des degrés Dornic avoisinant 35 °D.

En revanche, les souches des olives (Lactobacilles) et d'autre appartienent de piment (*Weissella* sp.) ont présenté une acidification très faible (pH \geq 6.2 ; acidité \leq 30 °D).

Ces résultats paraissent cohérents avec les observations de **Demir & Belarbi (2020)** et de **Mezarja (2019)**, qui signalent que certaines souches lactiques présentent une faible activité acidogène malgré leur croissance.

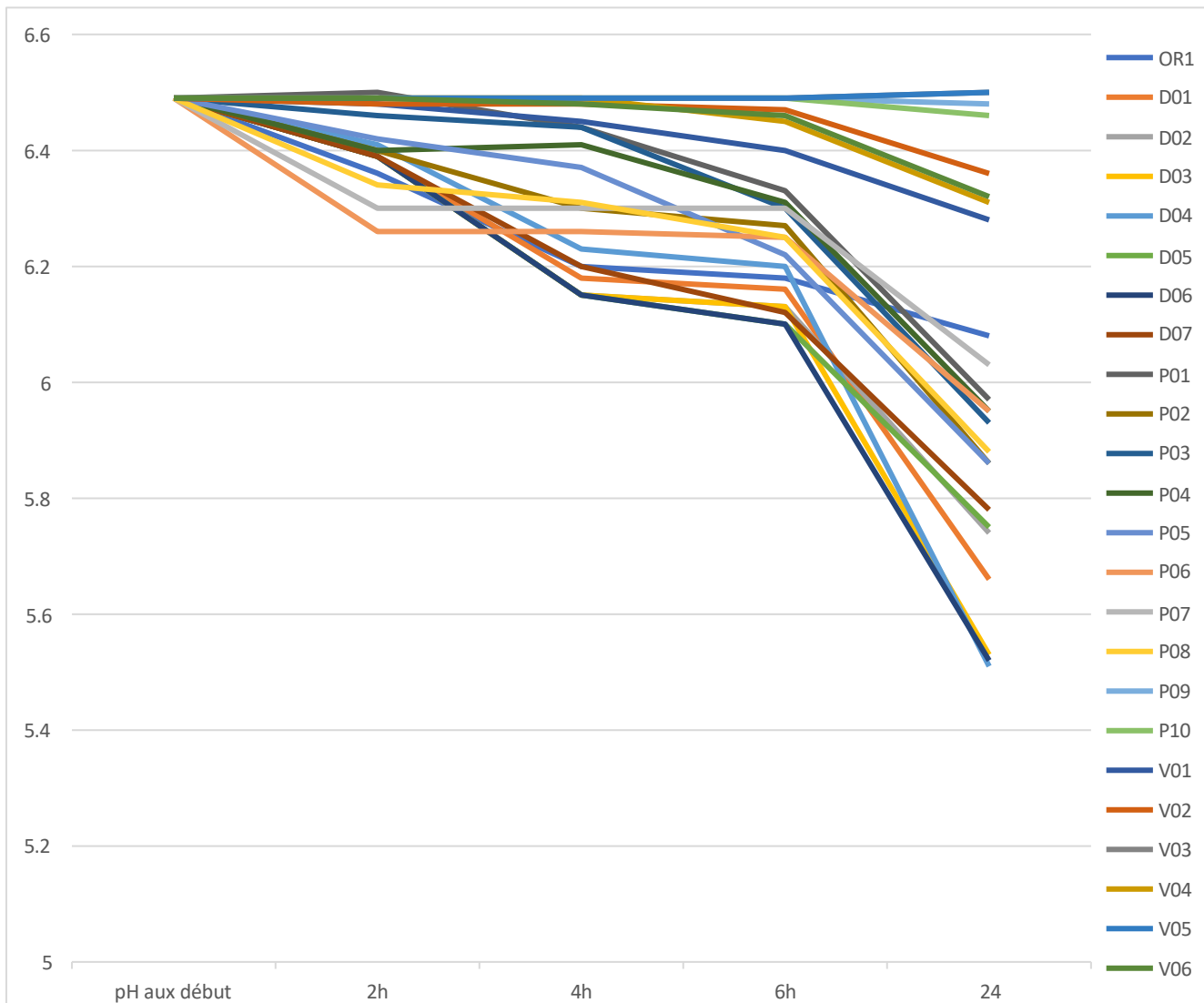


Figure 20 : Evolution du pH des isolats lactiques en fonction du temps

3.3.2 Activité Protéolytique

L'évaluation de l'activité protéolytique des souches a été réalisée sur un milieu MRS additionné du lait écrémé comme source principale de protéines (**figure 21**). Cette activité est déterminée par la capacité des bactéries à libérer des peptides ou acides aminés à partir des caséines, observée par la formation des halos de clarification autour des colonies. Cette aptitude est cruciale dans les fermentations fromagères, car elle contribue à la libération de précurseurs aromatiques et à la texture (**Zhang et Cai, 2014 ; Mozzi et al., 2011**).

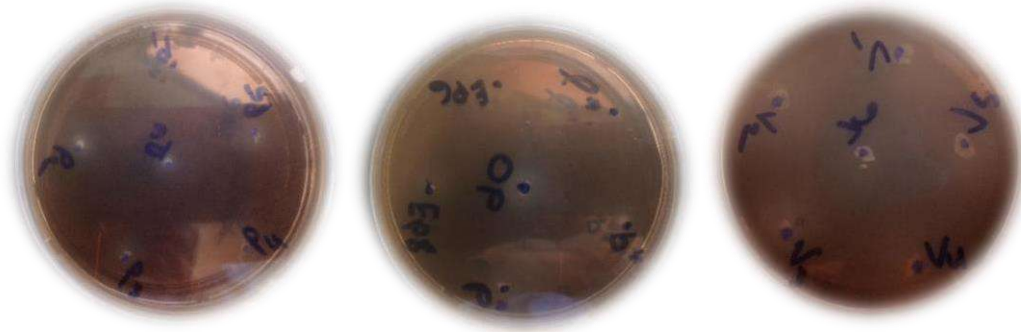


Figure 21 : Résultat de l'activité proteolytique

Dans ce travail, l'ensemble des souches ont présenté une activité très faible, voire inexistante, aucune zone nette de protéolyse n'étant détectée autour des colonies. Ces résultats suggèrent que les isolats, bien qu'efficaces pour la fermentation, ne présentent pas un fort pouvoir d'hydrolyse protéique, ce qui est typique de nombreuses souches lactiques d'origine végétale (**Demir et Belarbi, 2020**). **Bouricha (2022)** signalent également une faible activité protéolytique parmi les souches de *Leuconostoc* et *Lb. plantarum* isolées de légumes fermentés en Algérie. Cette faible activité protéolytique peut limiter leur aptitude à la maturation de produits fermentés complexes, mais demeure compatible pour des produits frais comme les fromages blancs, où une texture douce et stable est recherchée sans développement de saveurs prononcées.

3.3.3 Activité Lipolytique :

L'activité lipolytique a été testée par culture sur gélose contenant des substrats lipidiques comme le Tween 80. Ce test évalue la capacité des souches à produire des lipases extracellulaires, ce qui est important dans certains produits fermentés où les acides gras libres contribuent à la flaveur ou à la texture (**Zhang & Cai, 2014**). Aucune souche testée n'a présenté de halo d'hydrolyse lipidique, ce qui indique une absence complète d'activité lipolytique mesurable dans

les conditions de test. Cela est conforme aux observations faites par **Mozzi et al., (2011)**, selon lesquelles la majorité des bactéries lactiques végétales ne présentent pas de lipase, sauf dans des cas très particuliers liés à des espèces comme *Enterococcus faecalis* ou *Lactobacillus helveticus* d'origine laitière. Sur le plan technologique, l'absence d'activité lipolytique est considérée comme positive pour les produits frais, car elle prévient la formation de composés amers ou oxydés.



Figure 22 : Résultats de l'activité lipolytique.

3.3.4 Activité Texturante

La capacité des souches à produire des exopolysaccharides a été évaluée sur milieu MSE contenant du saccharose. La majorité des souches présentaient une production positive d'EPS, se manifestant par des colonies visqueuses, bien que le niveau de production varie selon les isolats. Les souches *D02* (dattes) et *ORI* (orange) ont montré une production très élevée (+++), tandis que les autres souches (*D07*, *P01*, *P02*, *P03*, *P04*, *P05*, *P06*, *P07*, *P08*, *V01*, *V02*, *V03*, *V04*, *V05* et *V06*) présentaient une production modérée (+). Alors que les souches issues des piments et quelques d'autres d'origine les dates (*D01*, *D03*, *D04*, *D05*, *D06*, *P09*, *P10*, *P11*) étaient incapables de produire des EPS sur MSE.

La production d'EPS représente un avantage technologique, améliorant la texture et la viscosité des produits fermentés, tout en limitant la séparation de petit-lait (synérèse) (**Mozzi et al., 2011 ; Zhang & Cai, 2014**).



Figure 23 : résultat de test de l'activité texturant

3.3.5 Activités aromatisantes

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

D'après les résultats du test de la réaction de Vogues Proskauer : tous les isolats se sont illustrés par une légère coloration vers le blanc dans le milieu Clark et Lubs, ce résultat est négatif quant à la production d'acétoïne pour tous les isolats testés à l'exception des quelques isolats de *Lactobacillus* (V01, V03, V04).

Les souches V1, V3 et V4 arrivent à produire des arômes comme l'acétoïne détecté par l'apparition d'un anneau rose-rouge à l'interface, donc ils ont un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.

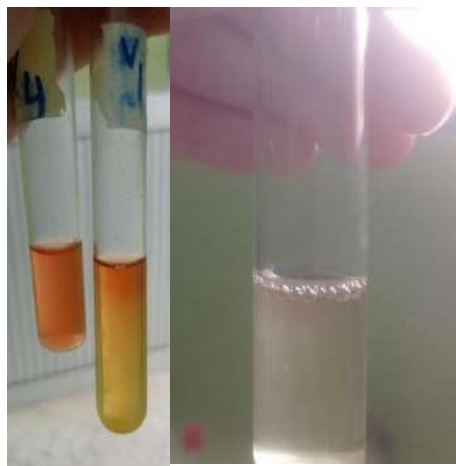


Figure 24 : Résultat positif de l'activité aromatisante

3.3.6 Activité Antimicrobienne

Le potentiel antimicrobien a été évalué contre deux bactéries pathogènes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en l'absence de souches de référence codées (ATCC), en utilisant une méthode de diffusion sur gélose. Aucune des souches testées n'a présenté de zone d'inhibition significative autour des disques. Ces résultats suggèrent une absence de production de composés antimicrobiens actifs dans les conditions de culture choisies (pH neutre, température standard). **Alameri (2022) et Zehra et al., (2014)** ont signalé des observations similaires sur des souches isolées de légumes, en expliquant que l'activité antimicrobienne chez les LAB dépend souvent de facteurs environnementaux spécifiques (acidité, peptones, stress oxydatif) et ne s'exprime pas toujours in vitro.

3.3.7 Activité Antagoniste Inter-souches

Dans une démarche d'association de souches pour la fermentation fromagère, un test d'antagonisme inter-souches a été mené entre les cinq isolats les plus acidifiants (D05, D06, D03, D07, P02) que sont des Entérocoques, *Weissella* et Lactobacilles, L'objectif était d'évaluer leur compatibilité biologique via un test de diffusion sur gélose PCA. Les résultats montrent une bonne compatibilité entre toutes les souches, à l'exception de P2, qui a exercé une inhibition légère (0.5-1mm) contre toutes les autres souches. Ce comportement suggère la production d'un métabolite diffusible inhibiteur, probablement un acide organique ou probablement un acide organique ou une bactériocine de faible poids moléculaire à spectre d'action non caractérisé, comme cela a été observé chez *L. Plantarum* (**Zehra et al., 2014 ; Alameri, 2022**). Cette observation impose la prudence dans l'usage de P2 dans des cultures mixtes, car même une faible inhibition peut déséquilibrer un écosystème fermentaire.

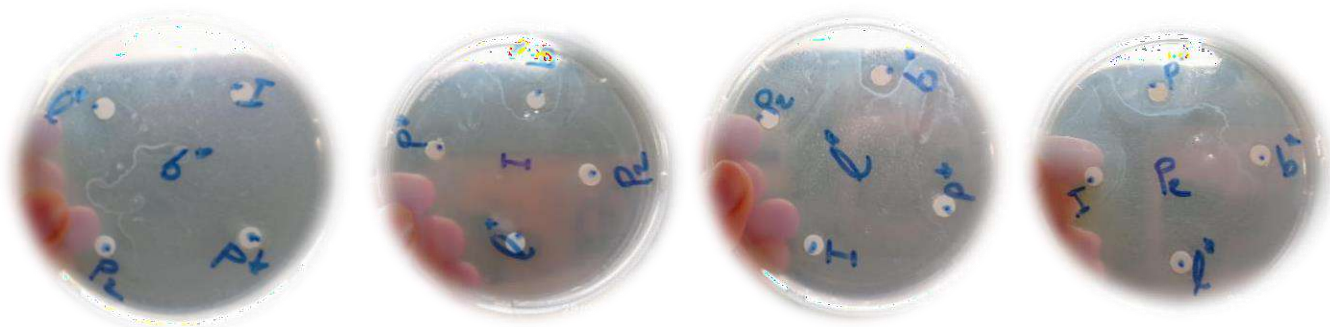


Figure 25 : Résultat du test de l'activité antagoniste.

3.4. Production de fromage frais

La fabrication expérimentale a permis d'obtenir un fromage frais, caractérisé par une coagulation lactique homogène, une texture humide et une couleur blanche, conforme aux propriétés attendues de ce type de produit.

Les souches lactiques d'origine végétale sélectionnées ont démontré une bonne aptitude à la fermentation du lait. En effet, la masse du fromage obtenu varie selon la souche utilisée. La souche D06 (*Enterococcus sp*) a permis d'obtenir une quantité de 80 g de fromage à partir du 2 litres de lait, tandis que la souche D05 (*Enterococcus sp*) a généré une quantité nettement plus élevée de 250 g à partir des mêmes 2 litres de lait. L'association des deux souches (D06 + D05) a donné une quantité légèrement supérieure atteignant 270 g. Ces différences de quantité peuvent être attribuées à des variations dans la cinétique d'acidification et la structuration du réseau de coagulation, chaque souche présentant des interactions métaboliques spécifiques avec les protéines du lait. De telles variations inter-souches sont fréquemment observées même même en présence d'une activité enzymatique secondaire minimale ou non significative (**Moizzi et al., 2011 ; Zhang et Cai, 2014**).



Figure 26 : Le fromage obtenu de l'association des 2 souches D05 et D06 pendant l'égouttage

Le pH du lactosérum recueilli après égouttage constitue un bon indicateur indirect de l'acidification atteinte par les souches utilisées. Les mesures ont révélé des valeurs de pH de 4,4 pour le fromage inoculé avec la souche D06, 4,5 pour celui de D05, et 4,7 pour la combinaison des deux ferments. Ces valeurs indiquent que les deux souches individuelles présentent une capacité acidifiante satisfaisante, atteignant un niveau d'acidité comparable à celui attendu dans les fromages frais industriels, où le pH est généralement compris entre 4,6 et 4,8 au moment de

l'égouttage (Corrieu et Luquet, 2008). Le mélange des deux souches montre toutefois une acidification légèrement moindre (pH 4,7), possiblement en lien avec une interaction entre les ferments ralentissant légèrement la production d'acide lactique en co-culture. Ces résultats confirment que les souches lactiques sélectionnées initialement pour leur forte activité acidifiante en culture de laboratoire, ont su maintenir cette aptitude lors du passage à la fabrication fromagère expérimentale. Selon Mezarja (2020) et Demir et Belarbi (2020), l'atteinte d'un pH inférieur à 4,6 est un critère essentiel pour assurer la stabilité microbiologique et la qualité texturale des fromages frais.

3.5. L'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle a été réalisée auprès de 20 dégustateurs afin d'évaluer l'impact des différents ferments sur la qualité organoleptique des fromages frais obtenus.

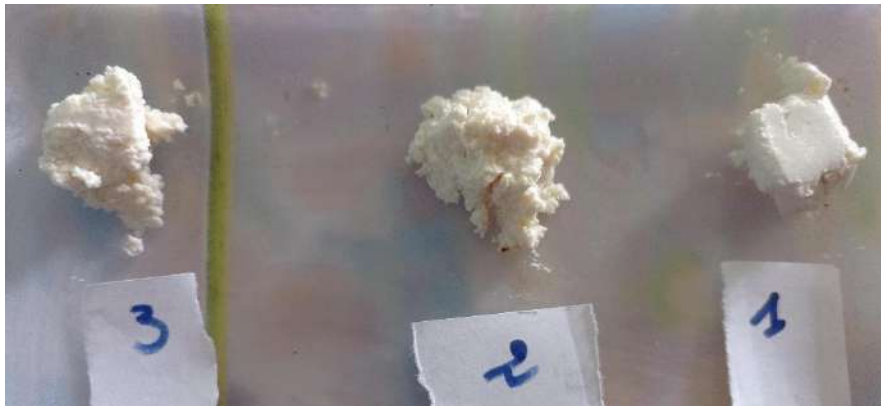


Figure 27 : Aspect visuel des fromages frais obtenus avec les souches D05 (1), D06 (2) et leur association (3).

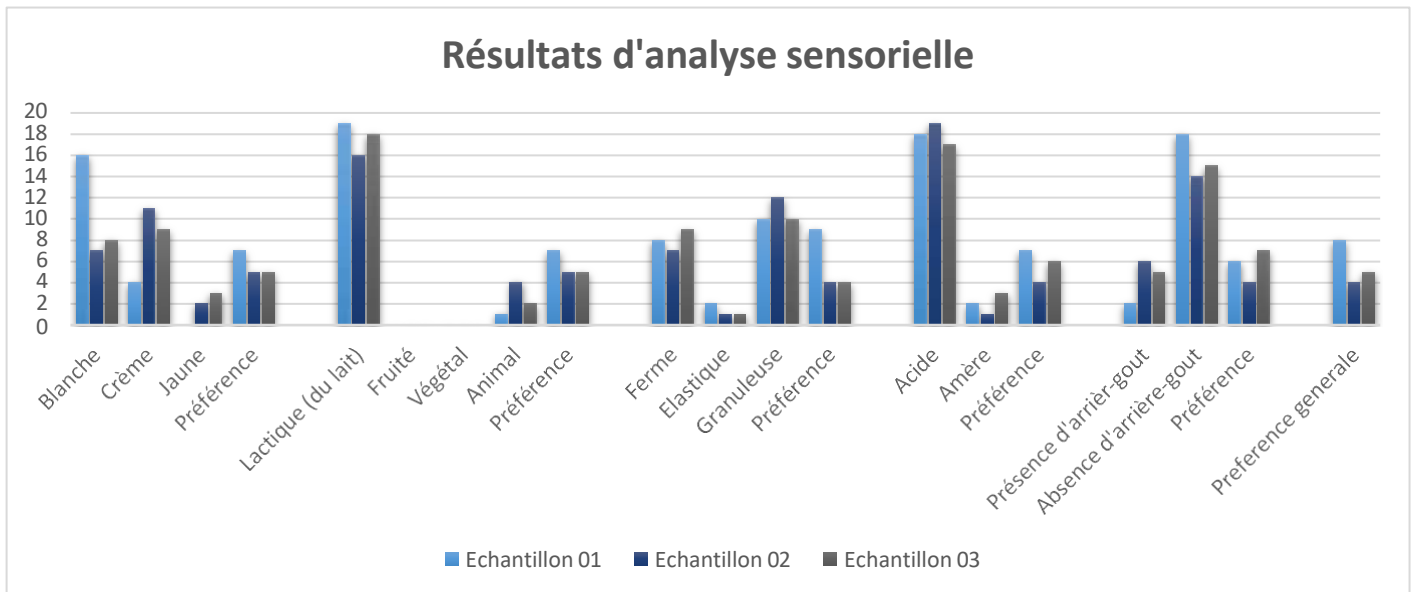


Figure 28 : Répartition des notes attribuées aux critères sensoriels des fromages expérimentaux

La figure 28 illustre les résultats de l'analyse sensorielle menée sur les trois échantillons de fromages, en se basant sur plusieurs critères organoleptiques : l'aspect visuel, l'odeur, la saveur, l'arrière-goût et la préférence globale. Ces résultats mettent en évidence des différences notables entre les fromages produits avec les deux souches séparément (D05 et D06) et leur mélange.

L'échantillon 1, produit avec la souche D06 pré-identifiée comme *Enterococcus faecalis*, s'est distingué par les meilleures appréciations : une couleur blanche bien marquée (16/20), une odeur lactique dominante (19/20) et une saveur acidulée naturelle (18/20). Ces caractéristiques ont conduit à une préférence globale majoritaire (8/20). Cette supériorité sensorielle peut s'expliquer par une acidification plus homogène et une texture plus fine, possiblement liée à une activité texturante intrinsèque de la souche. La blancheur du caillé pourrait également témoigner d'une meilleure homogénéité de coagulation (Mozzi et al., 2011 ; Demir et Belarbi, 2020).

L'échantillon 2, élaboré avec la souche D05 (*Enterococcus sp*), a montré une acidité également marquée mais une couleur légèrement plus crème, perçue comme moins attrayante par certains dégustateurs (seulement 7 votes pour l'aspect blanc). Sa texture a été jugée un peu plus granuleuse, ce qui a affecté sa préférence globale (4/20).

L'échantillon 3, issu du mélange des deux souches, a été relativement bien accepté (5/20), mais n'a pas montré de synergie sensorielle notable. L'aspect visuel a été décrit comme variable, allant du blanc au crème, et les critères gustatifs similaires à ceux des souches individuelles. Cela pourrait indiquer une certaine redondance fonctionnelle entre les deux ferments, sans effet complémentaire remarquable.

Dans l'ensemble, l'absence d'arrière-goût désagréable, la dominance de notes lactiques et l'équilibre acide observés dans les trois fromages traduisent un bon comportement technologique des souches sélectionnées, en particulier de la souche D06 qui a démontré le plus fort potentiel en termes d'acceptabilité sensorielle.

Conclusion

Conclusion

Ce travail a permis l'isolement et la sélection de vingt-cinq souches de bactéries lactiques (BL) issues des végétaux tels que les dattes, les olives, les oranges et les piments. Ces souches ont été caractérisées à travers une série de tests phénotypiques, biochimiques et technologiques afin d'évaluer leur potentiel en tant que ferments pour la production de fromage frais.

L'isolement a révélé une grande diversité morphologique parmi les colonies, mais seuls les isolats catalase-négatifs et Gram-positifs ont été retenus.

Les tests physiologique et biochimiques ont mis en évidence une prédominance de souches mésophiles et homofermentaires, avec une faible résistance aux conditions extrêmes (NaCl 6,5 %, pH 9,6), à l'exception de quelques souches thermotolérantes.

L'activité acidifiante a permis de différencier les souches selon leur rapidité à acidifier le lait. Certaines, en particulier celles issues des dattes, ont démontré une forte capacité à baisser le pH en 24 h. Les tests technologiques ont montré également une activité protéolytique et lipolytique faible ou non significative, mais plusieurs souches se sont distinguées par leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS), conférant un intérêt pour la texture. L'activité aromatisante était limitée à certaines souches d'olives, et l'activité antibactérienne globale s'est révélée faible.

Les souches les plus prometteuses (*Enterococcus sp*) ont été exploitées pour produire du fromage frais expérimentalement. L'analyse sensorielle a révélé une préférence pour le fromage produit à partir d'une souche isolée des dattes (*Enterococcus*), confirmant sa qualité acidifiante et organoleptique.

En fin, ce travail a permis de démontrer le potentiel technologique de certaines souches de BL d'origine végétale, notamment pour l'acidification et la production de fromages frais acceptables sur le plan sensoriel.

Cependant, plusieurs éléments doivent être maîtrisés pour envisager une valorisation

industrielle réelle des ferments sélectionnés tels que :

- ☐ l'identification des isolats lactiques par des méthodes moléculaires (séquençage 16S, PCR....) ;
- ☐ La caractérisation des propriétés probiotiques des souches lactiques (tolérance à l'acide, la bile, et capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales...) ;
- ☐ La détermination précise des concentrations des levains lactiques optimales ;
- ☐ L'évaluation de la stabilité des souches lactiques en conditions réelles de production ;
- ☐ La réalisation d'une étude de faisabilité technico-économique afin de valoriser les ferments obtenues .

*Références
bibliographiques*

A

- 1 **Alameri, F. K.** (2022). Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: Potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects (Doctoral dissertation, United Arab Emirates University). https://scholarworks.uaeu.ac.ae/all_theses/957
- 2 **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & 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*, *17*(6), 454–461.

B

- 3 **Badis, Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R.** (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chevre de deux populations caprines « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie C*, *23*, 30–37.
- 4 **M. Barkha, I., & Khakha, H. S. Bouricha, M.** (2021). Étude et caractérisation des bactéries lactiques de S'men élaboré à partir du lait de chamelle [Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah – Ouargla, sous la direction de M. Bouricha].
- 5 **Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. F., & Obert, J. P.** (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques.
- 6 **Bjorkroth, J. A., Holzapfel, W. H., & Dicks, L. M.** (2009). Genus *Leuconostoc*. In P. De Vos et al. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology: The firmicutes* (2nd ed., Vol. 3). Springer.
- 7 **Boudersa, W., & Nekkaa, R.** (2017). Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé [Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri – Constantine].
- 8 **Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., & Garmyn, D.** (2001). Diacetyl production via citrate metabolism in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *84*(11), 2480–2486.
- 9 **BOUMEDIENE K., 2013.** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen PP 30-38
- 10 **Bourgeois, C. M., & Larpent, J. P.** (1996). *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Tec & Doc.
- 11 **Bouricha, M.** (2022). Potentiel technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle de la région d'Ouargla [Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah – Ouargla].

C

- 12 **Casalta, E., Vassal, Y., Desmazeaud, M. J., & Casabianca, F.** (1995). Comparative acidification activity of *Lactococcus lactis* strains isolated from Corsican milk and cheese. *LWT – Food Science and Technology*, *28*(3), 291–299.
- 13 **Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., & Reinheimer, J.** (2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (pp.

177–192). Wiley-Blackwell.

- 14 **Chamba, J. F.** (2008). Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In G. Corrieu & F. M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques: De la génétique aux ferments* (pp. 787–815). Lavoisier.
- 15 **Chen, W., & Narbad, A.** (2018). *Lactic acid bacteria in foodborne hazards reduction*. Springer.
- 16 **Chethouna, F.** (2021). Contribution à l'étude des substances antibactériennes produites par la flore lactique isolée à partir du lait camelin (*Camelus dromedarius*) de la région d'Ouargla [Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah – Ouargla].
- 17 **Cholet, O.** (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire [Thèse de doctorat, INAPG (AgroParisTech)].

D

- 18 **Demir, N., & Belarbi, A.** (2020). Isolement et identification des bactéries lactiques à partir des fruits et légumes frais [Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira – Bejaia].
- 19 **Doleyres, Y.** (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées [Thèse de doctorat, Université Laval].
- 20 **Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, 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. *Le Lait*, *86*, 21–38.
- 21 **Drider, D., & Prevost, H.** (2009). *Bactéries Lactiques : Physiologie, Métabolisme, Génomique et applications industrielles*.

E

- 22 **El Soda, M., Hassan, A., & Adris, S.** (2000). Lactic acid bacteria as functional starter cultures in fermented dairy products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, i. *25*(6), 295–301.
- 23 **Endo, A., Tanizawa, Y., & Arita, M.** (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples. In D. Gänzle (Ed.), *Lactic acid bacteria: Methods and protocols* (pp. 3–5). Springer.

G

- 24 **Gasmi, A., et al.** (2023). Production de ferment à base de bactéries lactiques à effet probiotique [Mémoire de Master, Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi – Tébessa].
- 25 **Gibson, T., & Abdel-Malek, Y.** (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *Journal of Dairy Research*, *14*(1–2), 35–44.
- 26 **Guiraud, J. P.** (2012). *Microbiologie Alimentaire*. Dunod.
- 27 **Guiraud, J. P., & Rosec, J. P.** (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Afnor.

H

- 28 **Hami, & Terras.** (2020). Les propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques partir d'ensilage [Mémoire de Master, Université Dr. Moulay Tahar de Saida].
- 29 **Haydersah, J.** (2010). Étude de la fermentation lactique de plantes amylacées tropicales Potentiel des bacteries lactiques amylolytiques [Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane].
- 30 **Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B.** (2014). *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. Wiley-Blackwell.
- 31 **Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B.** (Eds.). (2016). *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. Wiley.

J

- 32 **Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., & Brule, G.** (2008). *Les produits laitiers* (2nd ed.). Tec & Doc.

K

- 33 **Kanauchi, M.** (Ed.). (2019). *Lactic acid bacteria: Methods and protocols*. Springer.

L

- 34 **Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., & Ouhssine, M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, i. *144*(3-4), 237-250.
- 35 **Laffargue, C.** (2015). Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine [Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier].
- 36 **Leclercq-Perlat, M.-N., & Corrieu, G.** (2000). Formation des composés aromatiques par les bactéries lactiques. *Lait*, *80*(5), 621-641.
- 37 **Luquet, F. M.** (1986). *Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition)*. Technique et Documentation.

M

- 38 **Mäyrä-Mäkinen, A., & Bigret, M.** (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3rd ed., pp. 73-102). Marcel Dekker.
- 39 **Meghoufel, N.** (2019). Étude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager [Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem].
- 40 **Meghoufel, S.** (2019). Essai de fabrication d'un fromage frais à base de ferments lactiques indigènes [Mémoire de Master, Université de Mostaganem].

- 41 **Mezarja, S.** (2020). Étude des propriétés technologiques des bactéries lactiques isolées de végétaux fermentés [Mémoire de Master, Université de Bejaia].
- 42 **Mohammed, A., & Homci, S.** (2023). Caractérisation de la production d'EPS chez les bactéries lactiques. *Revue Algérienne de Microbiologie Appliquée*, *7*(2), 85–93.
- 43 **Monnet, C., Latrille, E., Béal, C., & Corrieu, G.** (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques.
- 44 **Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M.** (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Blackwell.
- 45 **Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M.** (2011). *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*. CRC Press.
- 46 **Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M.** (2011). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Wiley.
- 47 **Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M.** (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Wiley.

R

- 48 **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 Journal of Science Research*, *34*(2), 218–227.
- 49 **Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Alonso, R. M., & de las Rivas, B.** (2017). Lactic acid bacteria as functional cultures. *Food Research International*, *95*, 52–61.
- 50 **Ruppitsch, W., Nisic, A., Hyden, P., Cabal, A., Sucher, J., Stöger, A., & Martinović, A.** (2021). Genetic diversity of *Leuconostoc mesenteroides* isolates from traditional Montenegrin brine cheese. *Microorganisms*, *9*(8), 1612.

S

- 51 **Salminen, S., Ouwehand, A., & von Wright, A.** (2004). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3rd ed.). Marcel Dekker.
- 52 **Savadogo, A., & Traore, A. S.** (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, i. *5*(5), 2057–2075.
- 53 **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. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2330–2335.
- 54 **St-Gelais, D., Turgeon, S. L., & Champagne, C. P.** (2002). Classification technologique des fromages frais. *INRA Productions Animales*, *15*(4), 257–268.

T

- 55 **Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H.** (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, *7*, i. 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- 56 **Thompson, J., & Gentry-Weeks, C.** (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques* (pp. 239–290). Loriga.

W

- 57 Wouters, J. T., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., & Smit, G.** (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, *12*(2–3), 91–109.

Z

- 58 Zamojska, M., Zmysłowska-Polakowska, E., & Brzezińska, B.** (2021). Lactic acid bacteria – occurrence and functional significance. *Journal of Food Quality*, *2021*, Article 6659057. <https://doi.org/10.1155/2021/6659057>
- 59 Zehra, K., Fatima, S., & Khan, M. A.** (2014). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria and their applications in food. *Food Science and Technology Journal*, *6*(2), 145–151.
- 60 Zhang, H., & Cai, Y.** (2014). *Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice*. Springer.

Annexe 1

Coloration différentielle de Gram

Préparation du frottis

En effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes :

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile ;
- Ajouter avec l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée ;
- Étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes ;
- Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

Réalisation de la coloration

- Verser le violet de gentiane sur la lame, laisser en contact 1 minute ;
- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 minute ;
- Jeter le Lugol et faire couler l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de Safranine Fushine, laisser agir environ 1 minute. Laver abondamment ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bensen ;
- Mettre une goutte d'huile à immersion sur la lame totalement sèche ;
- Observer au microscope à l'objectif x 100.

Annexe 2

Composition des milieux de culture utilisés

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure 5g
Extrait de viande 10g
Peptone caséine 10g
citrate de sodium 2g
acétate de sodium 5g
Glucose.....20g
KH₂PO₄.....2g
MgSO₄ 0.25g
MnSO₄ 0.05g
Agaragar 15g
Eau distillée 1000ml
pH 6.8
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre..... 1000ml
Rouge de methyle.....0.025ml
pH 7
Autoclavage 120°C/20minutes

Lait écrémé

Lait écrémé..... 100 g
Eau distillée..... 1000 ml
pH=7 Autoclavage 110°C, 10 minutes

Gélose PCA (Plant Count Agar)

Tryptone 5g
Extrait autolytique de levure 2.5g
Glucose..... 1g
Agar bactériologique 12g
pH 7
Autoclaver pendant 15 min à 121°C

Milieu Clark et Lubs

Peptone 7g
Phosphate dipotassique..... 5g
Glucose..... 5g
Eau distillée 1000ml
pH 7
Autoclaver 20 min à 120°C

Annexe 3

principaux étapes du fabrication de fromage frais



Début de fermentation



Coagulation



Egouttage

Annexe 4

Fiche de dégustation : Analyse sensorielle du fromage frais produit

Nom du dégustateur :

fonction : étudiant

Age :

date :

Tests	Sensation	Echantillon 01	Echantillon 02	Echantillon 03
Apparence externe (Couleur)	Blanche			
	Crème			
	Jaune			
	Préférence			
Odeur	Lactique (du lait)			
	Fruité			
	Végétal			
	Animal			
	Préférence			
Texture	Ferme			
	Elastique			
	Granuleuse			
	Préférence			
Saveur	Acide			
	Amère			
	Préférence			
Arrière-gout	Présence/absence			
	Préférence			

Observation aux dégustateurs : Mettre une croix sur l'appréciation (vocabulaire) accordée au produit dégusté.