

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Université Kasdi Merbah-Ouargla

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers
Département des Sciences de la Nature et de la Vie*

Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de

Magister

Option : Microbiologie Appliquée

Par : HadeF Sawsen

Thème

***Evaluation des aptitudes technologiques et
probiotiques
des bactéries lactiques locales***

Soutenu publiquement le : 18 / 04 / 2012

Devant le jury:

Président :	M^r Ould El Hadj M.D.	Professeur	(U.K.M.O)
Encadreur :	M^{me} Ould El Hadj-Khelil A.	Maître de conférences A	(U.K.M.O)
Co-encadreur :	M^r Idoui T.	Maître de conférences A	Université de Jijel
Examinatrices :	M^{me} Bissati S.	Professeur	(U.K.M.O)
	M^{me} Siboukeur O.	Maître de conférences A	(U.K.M.O)

Année Universitaire : 2011/2012

Remerciements

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

J'adresse mes plus vifs remerciements à M^r Idoui Tayeb, maître de conférences A à l'Université de Jijel, pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judiciaires et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Mes reconnaissants remerciements à M^{me} Ould El Hadj-Khelil Aminata, maître de conférences A à l'U.K.M.O., pour son aide et collaboration, sa compréhension et l'intérêt porté pour mon sujet.

Je suis particulièrement reconnaissante à M^r Ould El Hadj M.D., professeur à l'U.K.M.O, d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président ainsi que, M^{me} Bissati S., professeur à l'U.K.M.O, et M^{me} Siboukeur O., maître de conférences A à l'U.K.M.O, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.

Ma plus sincère gratitude à M^{me} Roula M. et M^r Leghouchi S. pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires et m'avoir donné les moyens de mener à bout cette étude.

Mes très spéciaux remerciements reviennent à ma famille et mes amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales

Résumé

Notre étude a conduit à l'isolement et l'identification de vingt-huit (28) souches de bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre originaire de la région de Jijel (Est d'Algérie). La totalité des isolats était des coques appartenant à trois genres : *Lactococcus* (53.74%), *Streptococcus* (32.14%) et *Leuconostoc* (14.28%) où *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* sont les deux sous-espèces dominantes avec des pourcentages de 32.14% et 28.57% respectivement.

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches présentent un bon pouvoir acidifiant, protéolytique, texturant mais un faible pouvoir lipolytique. L'étude des interactions a permis la constitution de deux ferments mixtes mésophiles. Ces derniers présentent de bonnes propriétés fonctionnelles (acidifiante, protéolytique, texturante, et aromatisante) qui peuvent être exploitées. Les aptitudes probiotiques (tolérance, à l'acidité, aux sels biliaires, aux sécrétions duodénales, à l'adhésion au tissu épithélial, à l'hydrophobicité, un pouvoir antimicrobien et une résistance aux antibiotiques) sont aussi révélées intéressantes.

L'application de ces ferments mixtes dans la technologie fromagère a révélé un meilleur rendement et une qualité organoleptique acceptable pour les fromages frais fabriqués.

Mots clés : Bactéries lactiques, beurre de chèvre, aptitudes technologiques, probiotique, fromage.

***Evaluation of technological and probiotic traits
of local lactic acid bacteria***

Abstract

Our study has permit the isolation and identification of twenty-eight (28) strains of lactic acid bacteria from traditional butter made from goat's milk in Jijel (East of Algeria). The totality of isolates were cocci and belonged to three genera: *Lactococcus* (53.74%), *Streptococcus* (32.14%) and *Leuconostoc* (14.28%) where *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* are the dominate species with percentages of 32.14% and 28.57% respectively.

The results of the evaluation of technological traits indicate that all strains present a good acidification, proteolytic activity and texturing aptitude with a weak lipolytic activity. The interactions allowed to the constitution of two mixed mesophilic starters. They have interesting functional (acidification, proteolytic, thickening, and aromatizing) which can utilizable. The probiotic properties (tolerance to acidity, bile salts, duodenal secretion, adhesion capacity to epithelial cells, hydrophobicity, antimicrobial activity and antibiotic resistance) are so interesting.

The application of these mixed starters in cheese-making technology revealed a better yield with an acceptable quality for the fresh cheese manufactured.

Key words: Lactic acid bacteria, goat's butter, technological aptitudes, probiotic, cheese.

تقييم المهارات التقنية والبروباوتكية للبكتيريا اللبنية المحلية

الملخص

سمحت لنا الدراسة المنجزة بعزل و تعريف ثمانية و عشرين سلالة من البكتريا اللبنية من زبدة الماعز لمنطقة جيجل (شرق الجزائر). تبين أن كل السلالات المعزولة هي ذات شكل كروي وتنتمي إلى ثلاث أجناس : *Lactococcus* (53.74%) ، *Streptococcus* (32.14%) ، *Leuconostoc* (14.28%) ، حيث أن *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* و *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* هما السلالتان الأكثر انتشارا حسب النسب المئوية 14.32 % و 57.28% على التوالي.

نتائج الاختبارات حول القابلية التكنولوجية أظهرت أن السلالات المعزولة لها قدرة جيدة على رفع حموضة الوسط ، هدم البروتينات، قدرة على رفع اللزوجة، لكن لها قدرة ضعيفة على تحليل الدهون. سمحت دراسة التفاعلات بين البكتريا اللبنية بتركيب خميرتين معتدلتين. هاتين الأخيرتين لهما خصائص وظيفية حسنة بحيث يمكن استغلالها (قدرة حمضية، هدم البروتينات، رفع لزوجة الوسط و قدرة عطرية). كما لهما خصائص بروبيوتكية مهمة (مقاومة كل من ارتفاع الحموضة ، الأملاح الصفراوية، إفرازات ألاتني عشر، القدرة على الالتصاق بالأنسجة والمركبات العضوية ، فاعلية مضادة للجراثيم و مقاومة المضادات الحيوية). أدى استعمال هذه الخمائر في تكنولوجيا صنع الأجبان إلى إعطاء مرد ودية جيدة و جبن طازج ذو نوعية مقبولة.

الكلمات المفتاحية : البكتريا اللبنية، زبدة الماعز، القابلية التكنولوجية، البروبيوتيك ، جبن.

Table des Matières

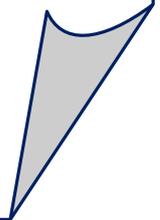


Table des Matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Introduction 01

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Présentation des bactéries lactiques	03
I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	03
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques	03
I.4. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques.....	05
I.4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	05
I.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	05
I.4.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	05
I.4.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	06
I.4.5. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	06
I.4.6. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	06
I.4.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	07
I.5. Principales voies fermentaire des bactéries lactiques.....	07
I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP	08
I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses-phosphate.....	08
I.6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques	09
I.7. Les ferments lactiques	09
I.7.1. Définition des ferments lactiques	09
I.7.2. Types de ferments lactiques	10
I.7.2.1. Selon la composition.....	10
I.7.2.2. Selon la température de croissance.....	10
I. 7.3. Les cultures mixtes des bactéries lactiques.....	11
I.7.3.1. Les interactions positives	11
I.7.3.2. Les interactions négatives	11
I.7.4. Critères de sélection des ferments lactiques.....	11
I.7.4.1. Critères de sécurité	11
I.7.4.2. Aptitudes technologiques	11
I.7.4.2. 1. Aptitude acidifiante	11
I.7.4.2. 2. Aptitude protéolytique	12
I.7.4.2. 3. Aptitude lipolytique.....	12
I.7.4.2. 4. Aptitude aromatisante.....	12
I.7.4.2. 5. Aptitude texturante	12
I.7.4.2. 6. Activité antimicrobienne.....	12
I.7.4.2. 7. Performance	13

II.8. Applications industrielles des bactéries lactiques.....	13
---	----

Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Historique de la définition des probiotiques.....	14
II.2. Les principales espèces des bactéries lactiques à potentiel probiotique.	14
II.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques	15
II.3.1. La résistance à l'acidité gastrique	15
II.3.2. La résistance aux sels biliaires.....	15
II.3.3. L'adhésion aux cellules épithéliales.....	16
II.3.4. La production de substances antimicrobiennes	16
II.3.5. Résistance aux antibiotiques.....	16
II.3.6. Critères technologiques	16
II.4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	17
II.5. Mécanisme d'action des probiotiques	17
II.6. Application des probiotiques	18

Chapitre III : Application des bactéries lactiques en technologie fromagère

III.1. Généralités sur les fromages.....	19
III.2. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie	19
III.3. Rôle et propriété attendus des bactéries lactiques en fromagerie.....	20
III.4. Définition et caractéristiques des fromages frais.....	20
III.5. Différents types de fromages frais.....	21
III.5.1. Les fromages blancs moulés.....	21
III.5.2. Les fromages blancs frais à structure homogène.....	21
III.6. Technologie de fabrication des fromages frais.....	21
III.6.1. Nature et choix des bactéries lactiques pour la fabrication des fromages frais.....	21
III.6.2. Le procédé fromager	21
III.6.2.1. Standardisation physico-chimique et biologique des laits	21
III.6.2.2. Coagulation.....	22
III.6.2.3. Egouttage.....	22
III.7. Principaux problèmes de fromagerie	24
III.8. Qualité des fromages.....	24
III.9. Rendement fromager.....	24

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel	25
II.1.1. Matériel biologique	25
II.1.2. Milieux de culture	26
II.1.3. Produits chimiques et réactifs	26

II.1.4. Tampons	27
II.1.5. Appareillage	27
II.2. Méthodes	27
II.2.1. Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre	27
II.2.1.1. Fabrication du beurre au laboratoire	27
II.2.1.2. Isolement et purification des bactéries lactiques	28
II.2.1.2.1. Préparation des dilutions décimales	28
II.2.1.2.2. Isolement et purification des isolats	28
II.2.1.3. Identification des bactéries lactiques isolées	28
II.2.1.3.1. Examen microscopique	28
II.2.1.3.2. Tests physiologiques et biochimiques	28
II.2.1.3.2. 1. Recherche de la catalase	28
II.2.1.3.2. 2. Croissance à différentes températures	28
II.2.1.3.2. 3. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	28
II.2.1.3.2. 4. Production d'acétoïne	29
II.2.1.3.2. 5. Culture sur lait de Sherman	29
II.2.1.3.2. 6. Culture sur milieu hypersalé	29
II.2.1.3.2. 7. Recherche de la réductase	29
II.2.1.3.2. 8. Recherche du type fermentaire	29
II.2.1.3.2. 9. Recherche de la citratase	30
II.2.1.3.2. 10. Test d'hémolyse	30
II.2.1.3.2. 11. Résistance au tellurite	30
II.2.1.3.2. 12. Profil fermentaire des sucres	30
II.2.2. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées	30
II.2.2.1. Pouvoir acidifiant	30
II.2.2.2. Pouvoir protéolytique	31
II.2.2.3. Pouvoir lipolytique	31
II.2.2.4. Pouvoir texturant	31
II.2.2.4.1. Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée	31
II.2.2.4.2. Quantification de la production des exopolysaccharides	31
II.2.3. Constitution d'un levain mésophile	32
II.2.3.1. Etude des interactions	32
II.2.3.2. Etude de quelques aptitudes technologiques des ferments mésophiles reconstitués	32
II.2.3.2.1. Pouvoir coagulant et acidifiant	32
II.2.3.2.2. Pouvoir épaississant	32
II.2.3.2.3. Pouvoir aromatisant	32
II.2.3.2.4. Pouvoir protéolytique	33
II.2.3.2.4. 1. Caractère protéolytique sur milieu MRS au lait	33
II.2.3.2.4. 2. Caractère protéolytique sur milieu Agar au lait	33
II.2.3.2.4. 3. Détermination de l'activité spécifique	33
II.2.4. Etude des aptitudes probiotiques des ferments mixtes reconstitués et des souches pures	34
II.2.4.1. Tolérance à l'acidité	34
II.2.4.2. Résistance aux sels biliaires	35
II.2.4.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal	35

II.2.4.4. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	35
II.2.4.5. Test d'hydrophobicité	36
II.2.4.6. Activité antibactérienne et effet des surnageants.....	36
II.2.4.7. Résistance aux antibiotiques.....	37
II.2.5. Fabrication d'un fromage frais type salé et persillé et évaluation de sa qualité	37
II.2.5.1. Technologie de fabrication.....	38
II.2.5.1.1. Préparation du lait et des ferments.....	38
II.2.5.1.2. Maturation	39
II.2.5.1.3. Emprésurage	39
II.2.5.1.4. Egouttage.....	39
II.2.5.1.5. Ajout d'additifs	39
II.2.5.1.6. Moulage.....	39
II.2.5.1.7. Conditionnement et stockage.....	39
II.2.5.2. Contrôle des fromages frais préparés.....	39
II.2.5.2.1. Contrôle physico-chimique	39
II.2.5.2.1.1. pH et acidité titrable	39
II.2.5.2.1.2. Détermination de la matière sèche	40
II.2.5.2.1.3. Détermination de la matière minérale	40
II.2.5.2.1.4. Calcul de la matière organique.....	40
II.2.5.2.1.5. Dosage des matières azotées.....	40
II.2.5.2.2. Contrôle microbiologique.....	41
II.2.5.2.2.1. Préparation des dilutions décimales	41
II.2.5.2.2.2. Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants.....	41
II.2.5.2.2.3. Dénombrement des levures et moisissures	41
II.2.5.2.2.4. Recherche des indologènes.....	41
II.2.5.2.2.5. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
II.2.5.2.2.6. Recherche de <i>Salmonella</i>	42
II.2.5.2.3. Analyse sensorielle	42
II.2.6. Analyse statistique	42

III. Résultats et Discussion

III.1. Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre	43
III.1.1. Examen macroscopique et microscopique	43
III.1.2. Tests physiologiques et biochimiques	43
III.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées	48
III.2.1. Pouvoir acidifiant.....	48
III.2.2. Pouvoir protéolytique.....	50
III.2.3. Pouvoir lipolytique	52
III.2.4. Pouvoir texturant	53
III.3. Interactions entre les bactéries lactiques et reconstitution de ferments mésophiles.....	55
III.4. Quelques aptitudes technologiques des ferments mixtes reconstitués.....	56
III.4.1. Pouvoir acidifiant et coagulant.....	56
III.4.2. Pouvoir épaississant.....	57

III.4.3. Pouvoir aromatisant	58
III.4.4. Aptitude protéolytique des ferments mixtes.....	59
III.4.4.1. Caractérisation de l'activité protéolytique	59
III.4.4.2. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases	62
III.4.4.3. Détermination de l'activité spécifique des endoprotéases	63
III.5. Aptitudes probiotiques des ferments mixtes	64
III.5.1. Résistance à l'acidité.....	64
III.5.2. Résistance aux sels biliaires	65
III.5.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal	67
III.5.4. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial	68
III.5.5. Test d'hydrophobicité	69
III.5.6. Activité antibactérienne	70
III.5.6.1. Effets des surnageants natifs	72
III.5.6.2. Effets des surnageants neutralisés.....	73
III.5.7. Résistance aux antibiotiques	74
III.6. Fabrication du fromage frais et évaluation de sa qualité	76
III.6.1. Le produit fini et le rendement fromager	76
III.6.2. Contrôle des fromages frais préparés.....	77
III.6.2.1 Qualité physico-chimique du fromage frais au cours de la conservation	77
III.6.2.1.1. Le pH et l'acidité	77
III.6.2.1.2. La matière sèche, organique et minérale	79
III.6.2.1.3. Evolution de la fraction azotée	80
III.6.2.2. Qualité microbiologique des fromages fabriqués	81
III.6.2.2.1. Les levures et moisissures	81
III.6.2.2.2. Les coliformes.....	82
III.6.2.2.3. La flore indologène, les staphylocoques et les salmonelles	84
III.6.2.3. Qualité sensorielle.....	84
Conclusion et perspectives	87

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Les principales espèces des bactéries lactiques à activité probiotique	13
Tableau 02 : Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques	14
Tableau 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	16
Tableau 04 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie.....	19
Tableau 05 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées	45
Tableau 06 : Profil fermentaire des souches isolées	46
Tableau 07 : Activité protéolytique des bactéries lactiques isolées.....	52
Tableau 08 : Activité lipolytique des bactéries lactiques isolées.....	53
Tableau 09 : Production de polysaccharides par les bactéries lactiques	54
Tableau 10 : Interactions entre les bactéries lactiques	56
Tableau 11 : Composition en souche des ferments mixtes mésophiles reconstitués	56
Tableau 12 : Pouvoir acidifiant des ferments mixtes sélectionnés	57
Tableau 13 : Activité protéinasique des exoprotéases sur milieu Agar au lait.....	61
Tableau 14 : Activité protéinasique des endoprotéases sur milieu Agar au lait.....	61
Tableau 15 : Activité spécifique des exoprotéases	62
Tableau 16 : Activité spécifique des endoprotéases	63
Tableau 17 : Adhésion des ferments mixtes et souches pures aux cellules épithéliales du colon et de l'iléum.....	68
Tableau 18 : Résultats de l'activité antibactérienne des ferments sur des germes tests (mm).....	70
Tableau 19 : Activité inhibitrice des surnageants natifs (mm).....	72
Tableau 20 : Activité inhibitrice des surnageants neutres (mm)	73
Tableau 21 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques	74
Tableau 22 : Le rendement fromager	77
Tableau 23 : Evolution de la fraction azotée des fromages fabriqués.....	81
Tableau 24 : Résultats du test de dégustation à T _{J0}	85
Tableau 25 : Résultats du test de dégustation à T _{J7}	86
Tableau 26 : Résultats du test de dégustation à T _{J15}	86

Liste des Figures

Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés obtenu par analyse des ARNr16S	04
Figure 02 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose	07
Figure 03 : Schéma du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i>	08
Figure 04 : Schéma générale de la technologie de fabrication des fromages frais	22
Figure 05 : Diagramme de fabrication du fromage frais type salé et persillé	35
Figure 06 : Répartition des espèces de la collection lactique (%).....	47
Figure 07 : Production d'acide lactique par les souches <i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> codées C01, C02, C04, C06, C13, C15, C16, C25 et C28	48
Figure 08 : Production d'acide lactique par les souches <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> codées C05, C07, C10, C12, C14, C19, C24 et C27	49
Figure 09 : Production d'acide lactique par les souches <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> codées C03, C18, C26, <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> codées C09, C22, C23 et <i>Lc. Raffinolactis</i> C08	49
Figure 10 : Production d'acide lactique par les souches <i>Ln. lactis</i> C11 et <i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> codées C17, C20, C21	50
Figure 11 : La résistance des souches pures et des ferments mixtes aux milieux acides	64
Figure 12 : La résistance des souches pures et des ferments mixtes aux sels biliaires	66
Figure 13 : des souches pures et des ferments mixtes au stimulus stomaco-duodéal.	67
.....	
Figure 14 : Hydrophobicité des souches pures et des ferments mixtes	69
.....	
Figure 15 : Evolution du pH des trois fromages frais fabriqués	78
Figure 16 : Evolution de l'acidité des trois fromages frais fabriqués	79
Figure 17 : Evolution de la matière sèche	73
Figure 18 : Evolution de la matière organique.....	80
Figure 19 : Evolution de la matière minérale.....	80
Figure 20 : Evolution de la charge en levures et moisissures dans les fromages fabriqués	82
Figure 21 : Evolution de la charge en coliformes totaux des fromages fabriqués	83
Figure 22 : Evolution de la charge en coliformes fécaux des fromages fabriqués	83

Liste des Photos

Photo 01 : Activité protéolytique sur milieu MRS au lait	51
Photo 02 : Aspect des colonies sur milieu hyersaccharosé.....	55
Photo 03 : Production des EPS par les bactéries lactiques	55
Photo 04 : Aspect du gel formé par les ferments mixtes F1 et F2	57
Photo 05 : Aspect des gels formés sur lait saccharosé	58
Photo 06 : Production de l'acétoïne par les ferments mixtes F1 et F2	58
Photo 07 : Activité protéolytique des ferments F1 et F2 sur milieu MRS au lait	59
Photo 08 : Zones de protéolyse sur milieu Agar au lait des exoprotéases et endoprotéases	60
Photo 09 : Test d'adhésion du ferment F2 au tissu épithélial du colon.	69
Photo 10 : Activité inhibitrice des souches pures et ferments mixtes sur <i>Klebsiella</i> sp.....	71
Photo 11 : Activité inhibitrice des surnageants natifs des souches pures et ferments mixtes sur <i>Listeria monocytogenes</i>	73
Photo 12 : Antibiogramme des deux ferments F1 et F2	74
Photo 13 : Aspect du fromage frais fabriqué	76
Photo 14 : Aspect visuel des fromages frais fabriqués	86

Liste des Abréviations

➤ Noms de genres bactériens

B. : *Bacillus*

Bf. : *Bifidobacterium*

E. : *Escherichia*

En. : *Enterococcus*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

P. : *Pediococcus*

S. : *Staphylococcus*

St. : *Streptococcus*

➤ Unités de mesures

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

cm, mm, nm : Centimètre, millimètre, nanomètre

g, mg : Gramme, milligramme

h, min, s : heure, minute, seconde

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

M, mM : Molaire, millimolaire

N : Normalité

rpm : Rotation par minute

U : Unité

UI : Unité Internationale

V/V : Volume par volume

➤ Autres abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

BSA : Albumine Sérique Bovine

DO : Densité Optique

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Food and Agriculture Organization

G+C : Guanine + Cytosine

GRAS: Generally Regarded As Safe

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

OGA : Gélose glucose à l'oxytétracyclique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

qsp : Quantité suffisante pour

SFB : Selenite F Broth

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

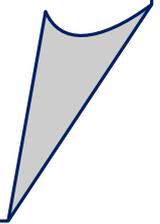
TCA : Acide Trichloroacétique

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra Violet

VRBL : Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

Introduction



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

Les ferments lactiques étaient constitués d'un mélange inconnu, non maîtrisé et variable, de plusieurs souches ou espèces de bactéries. Ils provenaient d'une fermentation naturelle dans le produit considéré. Une partie de ce produit fermenté était conservée, pour ensuite ensemençer les fermentations ultérieures. Actuellement, la production de ferments lactiques s'est développée au sein d'usines spécialisées, à partir de souches bactériennes isolées et sélectionnées (**Béal et al., 2008**).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou « probiotique » (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (**Doleyres et al., 2002**).

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

En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (Karam, 1995 ; Zadi, 1998 ; Guessas et Kihal, 2004 ; Cheriguene et al., 2006 ; Idoui, 2008). De même, des résultats de recherches sur la flore lactique du beurre traditionnel de vache, de brebis et de chamelle, ont été couronnés par des publications (Kacem et Karam, 2006 ; Idoui et Karam, 2008 ; Idoui et al., 2009). Cependant, peu de travaux ont été publiés sur la flore lactique de beurre de chèvre.

Notre présente étude répond à la nécessité d'avoir une banque de données sur un des patrimoines nationale, les bactéries lactiques du beurre de chèvre. A travers cette étude, nous allons mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant une application dans l'industrie alimentaire et, déterminer alors leurs propriétés technologiques et probiotiques.

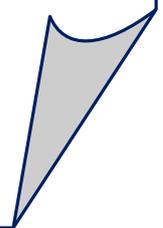
Notre manuscrit est structuré en trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de trois chapitres, le premier présente le groupe des bactéries lactiques, leurs principales caractéristiques et leurs utilisations en tant que ferments lactiques, les

bactéries lactiques probiotiques est détaillé dans le deuxième chapitre pour arriver au dernier chapitre qui traite les applications des bactéries lactiques en technologie fromagère.

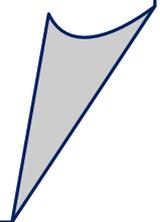
La seconde partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, ou sont détaillés les procédés d'identifications des bactéries lactiques isolées à partir du beurre de chèvre, la reconstitution de ferments mixtes mésophiles et l'étude de leurs propriétés technologiques et probiotiques. L'essai de fabrication d'un fromage frais en utilisant les levains reconstitués et évaluation de sa qualité sont également présentés. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont ensuite exposés dans la troisième partie et sont discutés.

Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

Synthèse Bibliographique



Chapitre I



Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Présentation des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX^e siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

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

I.3. Taxonomie des bactéries lactiques

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

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

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

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

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

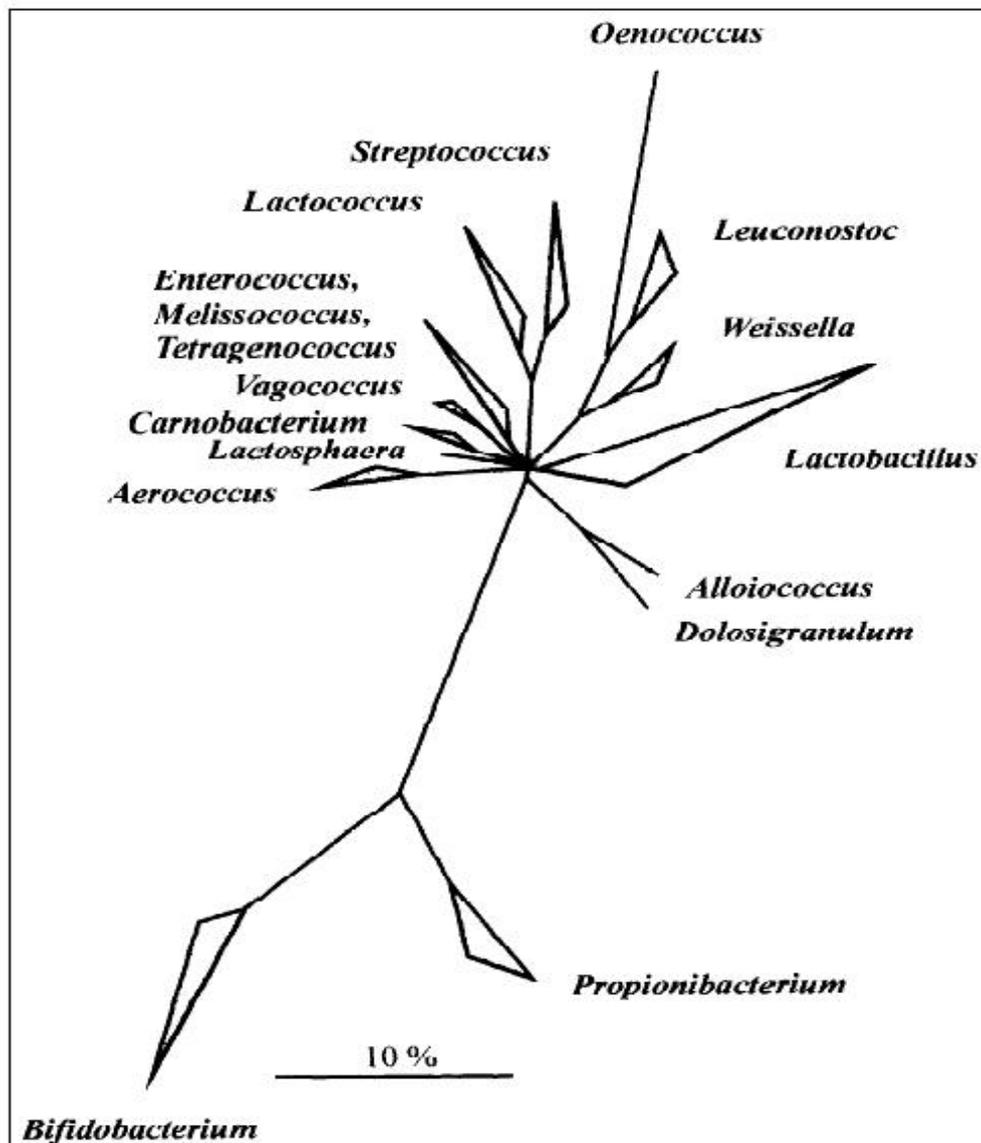


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

I.4.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

I.4.2. Le genre *Lactococcus*

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

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

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

I.4.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

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

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

I.4.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

I.4.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

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

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

I.4.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

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

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

I.4.7. Le genre *Bifidobacterium*

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

I.5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et al., 2008) :

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

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 02). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et al., 2008).

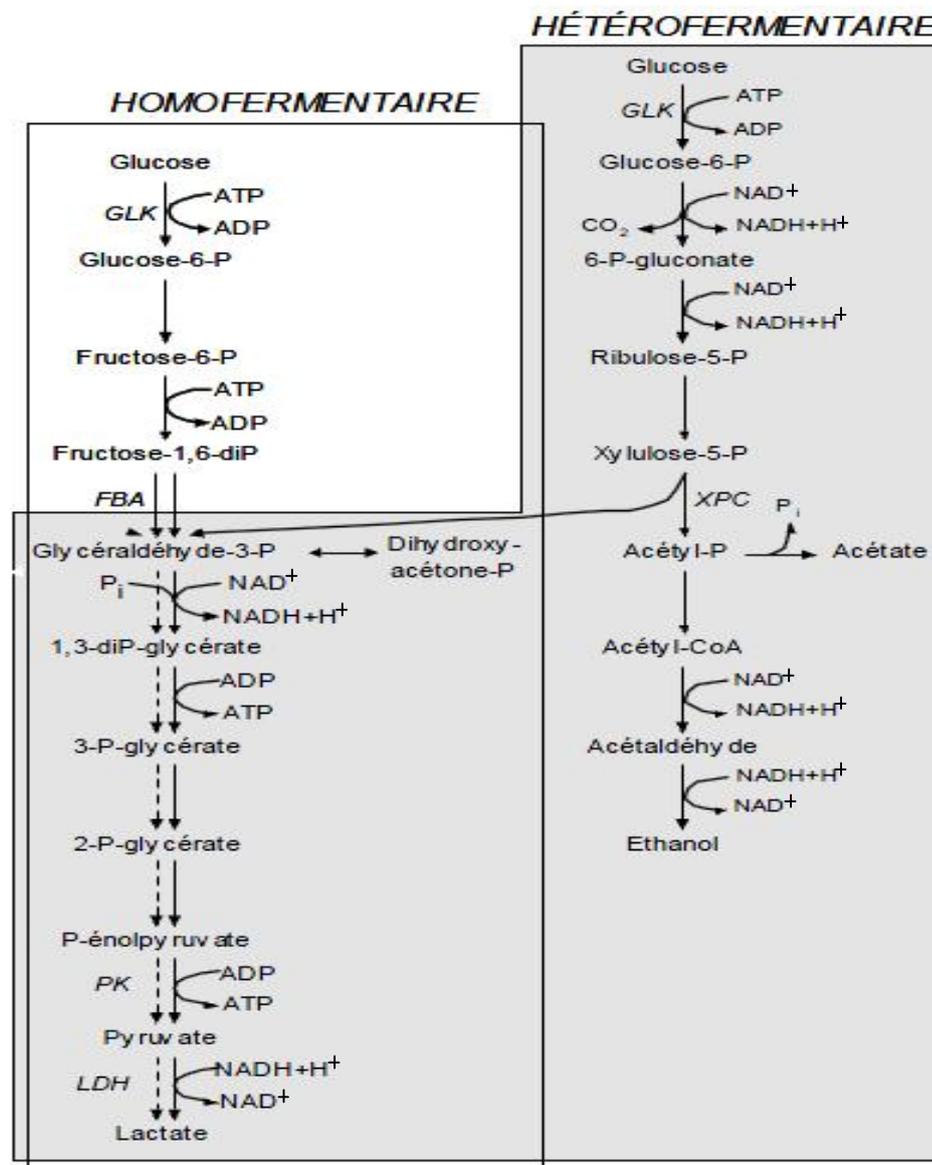


Figure 02 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).

[GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- biphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicocoques, 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. La fructose-1,6-biphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

I.6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques

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

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus* et ont permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse en trois étapes (figure 03) : la première étape fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tripeptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques. Enfin, dans le cytoplasme bactérien un éventail de peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (Savijoki et al., 2006 ; Atlan et al., 2008 ; Picon et al., 2010).

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

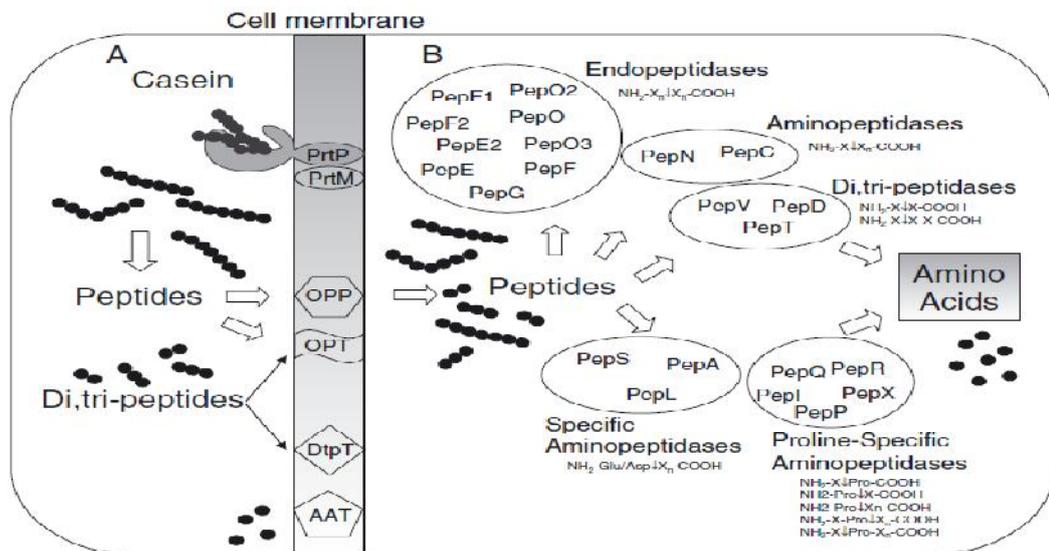


Figure 03 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

I.7. Les ferments lactiques

I.7.1. Définition des ferments lactiques

Un ferment est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules, d'un seul microorganisme ou plus, ajoutée à une matière première pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation. Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle important dans ces processus et une longue histoire d'application. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques

sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés comme les yaourts, le kéfir et les fromages (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004) .

I.7.2. Types de ferments lactiques

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

I.7.2.1. Selon la composition

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

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

I.7.2.2. Selon la température de croissance

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

- Ferments mésophiles

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C. Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*). Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre (Chamba, 2008 ; Carminati et al., 2010).

- Ferments thermophiles

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

I.7.3. Les cultures mixtes des bactéries lactiques

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en

deux catégories : les interactions *positives* qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions *négatives* qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet et al., 2008).

I.7.3.1. Les interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le *commensalisme* où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du *mutualisme* où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (Cholet, 2006).

I.7.3.2. Les interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'*amensalisme*. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de *compétition*. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats. L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrices, généralement spécifiques (Cholet, 2006 ; Monnet et al., 2008).

I.7.4. 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).

I.7.4.1. 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).

I.7.4.2. Aptitudes technologiques

a. Aptitude acidifiante

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

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

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

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet et al., 2008).

b. Aptitude protéolytique

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).

c. Aptitude lipolytique

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

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

d. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' α -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...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 et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006).

e. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (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. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007).

f. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui et al., 2005).

Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et

peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophile et la bulgaricane (Ogunbanwo et al., 2003 ; Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009).

g. Performance

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries. Les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes (Béal et al., 2008) :

- Résistance aux bactériophages et aux traitements mécaniques ;
- Tolérance aux inhibiteurs de croissance (antibiotiques, chlorure de sodium, saccharose, l'acidité, l'éthanol et la température élevée) ;
- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation et à la conservation ;
- Comportement en présence d'oxygène ;
- Croissance à des températures non optimales ;
- Compatibilité avec d'autres souches ;
- Facilité d'emploi.

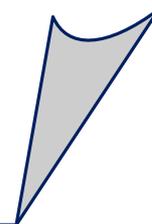
I.8. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit et al., 2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez et al., 2003).

Chapitre II



Chapitre II : Les probiotiques

II.1. Historique de la définition des probiotiques

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotiques a été développée principalement grâce aux travaux de **Metchnikoff** ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant dans le tube digestif la population de bactéries putréfiantes ou produisant des toxines. Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par **Lilly et Stillwell** en 1965. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (**Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005**).

En 1989, **Roy Fuller** a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (**Guarner et al., 2008**). La **FAO et l'OMS (2002)**, ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « *les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* ».

II.2. Les principales espèces des bactéries lactiques à potentiel probiotique

Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (**Gbassi et al., 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010**).

Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques sont répertoriées dans le tableau 01.

Tableau 01 : Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (**Shah, 2007**).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. johnsonni</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Espèces de <i>Bifidobacterium</i>		
<i>Bf. lactis</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Bf. infantis</i>
<i>Bf. longum</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bf. Breve</i>
<i>Bf. adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lc. lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. thermophilus</i>	

II.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne.

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaries, les enzymes pancréatiques...etc (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et al., 2008).

Le tableau 02 rapporte les critères les plus utilisés dans différents laboratoires pour le screening des probiotiques.

Tableau 02 : Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen et al., 2004).

Critères	But recherché
- Résistance à l'acidité gastrique	- Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
- Résistance aux sels biliaries	- Survie pendant le passage par l'intestin grêle
- Production d'acide (à partir de glucose et de lactose)	- Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
- Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	- Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
- Production de substances antimicrobiennes	- Inhibition du développement des germes pathogènes
- Résistance à la chaleur	- Survie pendant le processus de transformation
- Bonnes propriétés technologiques	- La stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

II.3.1. La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

II.3.2. La résistance aux sels biliaries

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaries est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire

face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008).

II.3.3. L'adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011).

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

II.3.4. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek et al., 1996 ; Labioui et al., 2005).

II.3.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et al. (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine.

Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007).

II.3.6. Critères technologiques

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela et al. (2000), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique ;

- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

II.4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Le tableau 03 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé documentés et rapportés dans la littérature.

Tableau 03 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques
(Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : - Mauvaise digestion du lactose - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques - Syndrome du côlon irritable - Constipation - Infection par <i>Helicobacter pylori</i> - Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né	- Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>)	Réduction du risque de : - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) - Coronaropathie - Maladie des voies urinaires - Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

II.5. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) jusqu'à leurs cible d'action dans le tractus digestif.

Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée ; ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité alimentaire et en stimulant l'immunité, ceci suggère qu'il faut un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001 ; Ait-Belgnaoui et al., 2005).

II.6. Applications des probiotiques

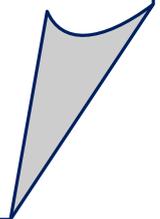
Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits plurisouches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (**Patterson, 2008**) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (**Patterson, 2008**).

La survie des probiotiques dans les produits est affectée par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation et de stockage. Les nouvelles technologies, comme la microencapsulation et la technologie des cellules immobilisées, offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires. Les fabricants commercialisent de nouveaux vecteurs d'administration de probiotiques comme des pailles et des capsules de bouteille qui, lorsque percées ou brisées, délivrent des doses thérapeutiques de probiotiques dans un produit alimentaire (**Kailasapathy, 2002 ; Patterson, 2008**).

Chapitre III



Chapitre III : Application des bactéries lactiques en technologie fromagère

III.1. Généralités sur les fromages

Les fromages sont des formes de conservation et de report ancestrales de la matière utile du lait (protéines, matière grasse ainsi qu'une partie du calcium et phosphore), dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans tout le globe. La définition « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origines exclusivement laitières (lait, 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).

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).

III.2. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie

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

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

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

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

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

Les principales fonctions des bactéries lactiques en fromagerie sont résumées dans le tableau 04.

Tableau 04 : Rôle des ferments lactiques en fromagerie (Branger et al., 2007).

Propriétés des ferments lactiques	Effets sur le produit
Transformer les sucres en acide lactique	Abaissement du pH - conservation des produits - limitation du développement de bactéries nuisibles - modification de la micelle de caséine Solubilisation des minéraux liés à la caséine - action sur l'égouttage des caillés (teneur en eau) - action sur la texture des fromages Diminution de la concentration en lactose - production de lactate (action sur la saveur des fromages)
Transformer les sucres en CO₂	Libération de CO ₂ - ouverture utile en pâtes molles et pâtes persillées - ouverture nuisible en pâtes pressées
Transformer les citrates	Formation de diacétyl - recherché en fromages à pâte fraîche et molles
Transformer la caséine	Protéolyse pendant la maturation - activation de la croissance (peptides, acides aminés) Protéolyse pendant l'affinage - modification de la texture, couleur, saveur
Produire des polysaccharides	Épaississement du milieu pour les pâtes fraîches - augmentation de la viscosité par libération de polysaccharide pendant la fermentation lactique

III.4. Définition et caractéristiques des fromages frais

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine. Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. Tous les fromages frais ont une DLC (date limite de consommation) de 24 jours (Mahaut et al., 2000 ; Luquet et Corrieu, 2005).

Les fromages frais regroupent des produits très variés en terme de matière grasse (entre 0 et 60% par rapport à l'extrait sec), la matière sèche totale est supérieure à 15%. Ils doivent renfermer une flore vivante au moment de la vente au consommateur (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Luquet et Corrieu, 2005).

III.5. Différents types de fromages frais

Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum, la teneur en matière grasse du lait mise en œuvre et les caractéristiques organoleptiques. Les diverses technologies employées permettent de distinguer les catégories de fromages suivantes (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Simon et al., 2002**) :

III.5.1. Les fromages blancs moulés

Le caillé garde son individualité à l'état de blocs ou de grains. Ces fromages sont généralement moulés à la louche tel que le fromage de type faisselle ou compagne.

III.5.2. Les fromages blancs frais à structure homogène

Ce type comporte :

- Les fromages à extrait sec faible et texture onctueuse comme les fromages blancs battus ou lissés ;
- Les fromages à extrait sec plus élevé et texture tartinable comme les petits suisses et les « demi-sel » (souvent aromatisés : ail, fines herbes, poivre...etc.).

III.6. Technologie de fabrication des fromages frais

III.6.1. Nature et choix des bactéries lactiques pour la fabrication des fromages frais

Lors de la fabrication des fromages frais, la coagulation du lait a lieu en dessous de 30°C, voir même 25°C, et l'acidification du coagulum jusqu'à un pH de 4.8, précède l'égouttage.

Dans cette technologie, ce sont exclusivement les bactéries mésophiles, capables de se développer aux températures employées, qui servent à l'ensemencement. Il s'agit donc de l'espèce *Lactococcus lactis* et ces deux sous espèces *lactis* et *cremoris*. Pour obtenir un caractère plus aromatique, le biovar. *diacetylactis* est fréquemment utilisé, ainsi que *Leuconostoc mesenteroides* (**Hassan et Frank, 2001 ; Branger et al., 2007 ; Chamba, 2008**).

III.6.2. Le procédé fromager

D'une manière générale, le fromage frais commercialisé est fabriqué soit à partir de lait de vache ou de lait de chèvre. Le processus général de fabrication se résume en trois grandes étapes essentielles : la maturation, la coagulation et l'égouttage (**Randazzo et al., 2002**).

La figure 04 présente le procédé générale de fabrication des fromages frais (**Jeantet et al., 2007**).

III.6.2.1. Standardisation physico-chimique et biologique des laits

Tout les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent un certain nombre de caractéristiques différentes (composition en caséines, en matière grasse, qualité hygiénique, pH,...etc.). Afin de s'affranchir des variations de la teneur en protéines des laits, les industriels ont la possibilité de régler le taux protéique des laits à l'aide de différentes techniques : élimination de l'eau par évaporation, concentration par filtration ou par ajout de caseinates. Les industriels effectuent notamment l'ajustement des teneurs en matière grasse, du pH d'emprésurage pour faciliter la coagulation du lait et l'ajout de minéraux (**St-Gelais et al., 2002 ; Jeantet et al., 2007**).

La standardisation biologique par traitement thermique, ou microfiltration, suivie d'addition d'une flore contrôlée permet de s'affranchir de la flore indésirable (psychrotrophes, germes pathogènes) ;

une prématuration (en favorisant la production de facteurs de croissance) permet d'améliorer le déroulement de la fermentation lactique (Jeantet et al., 2007).

III.6.2.2. Coagulation

La coagulation du lait peut se faire selon deux voies : acide ou mixte. La coagulation par voie acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique par acidification bactérienne (ferments lactiques) qui aboutit à la déstructuration des micelles de caséines avec une réorganisation de ces protéines en gel. La coagulation enzymatique présente la même finalité puisqu'elle consiste en la transformation du lait en gel par l'action d'enzymes protéolytiques qui vont préférentiellement hydrolyser les caséines κ , désorganisant ainsi les micelles et permettant ensuite leur réticulation. La coagulation mixte résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. Selon la méthode utilisée, le gel présente des propriétés différentes, par exemple lorsqu'il est obtenu par coagulation acide il est très friable et peu élastique, il résistera donc moins bien aux traitements mécaniques que le gel issu d'une coagulation enzymatique (Raynaud et al., 2003 ; Jeantet et al., 2007).

III.6.2.3. Egouttage

Lors de cette étape, la plus grande partie des éléments solubles sont éliminés dans le lactosérum. On peut considérer qu'il s'agit d'une déshydratation partielle du caillé. Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande de lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique. Elle commence dans les cuves de coagulation, puis se poursuit dans les moules et enfin en hâloirs. L'égouttage spontané d'un gel lactique est lent et limité, il conduit à un caillé hétérogène. Des procédés tels que la centrifugation et l'ultrafiltration du caillé permettent d'accélérer notablement l'égouttage, en comparaison des procédés traditionnels (égouttage en faisselle, en sac ou en filtre berge). Cependant, un gel présure est un gel compact, solide et l'égouttage ne peut avoir lieu qu'après certaines interventions telles que des actions mécaniques de pression (St-Gelais et al., 2002 ; Jeantet et al., 2007).

Suivant le goût du fromager, le salage peut être fait. Il est permis d'ajouter aux fromages frais des substances variées (dans une proportion ne dépassant pas les 30% du poids du produit fini) : le sucre (saccharose), les matières aromatiques naturelles, fruits, pulpes et jus de fruits, confitures, miel et colorants (Randazzo et al., 2002).

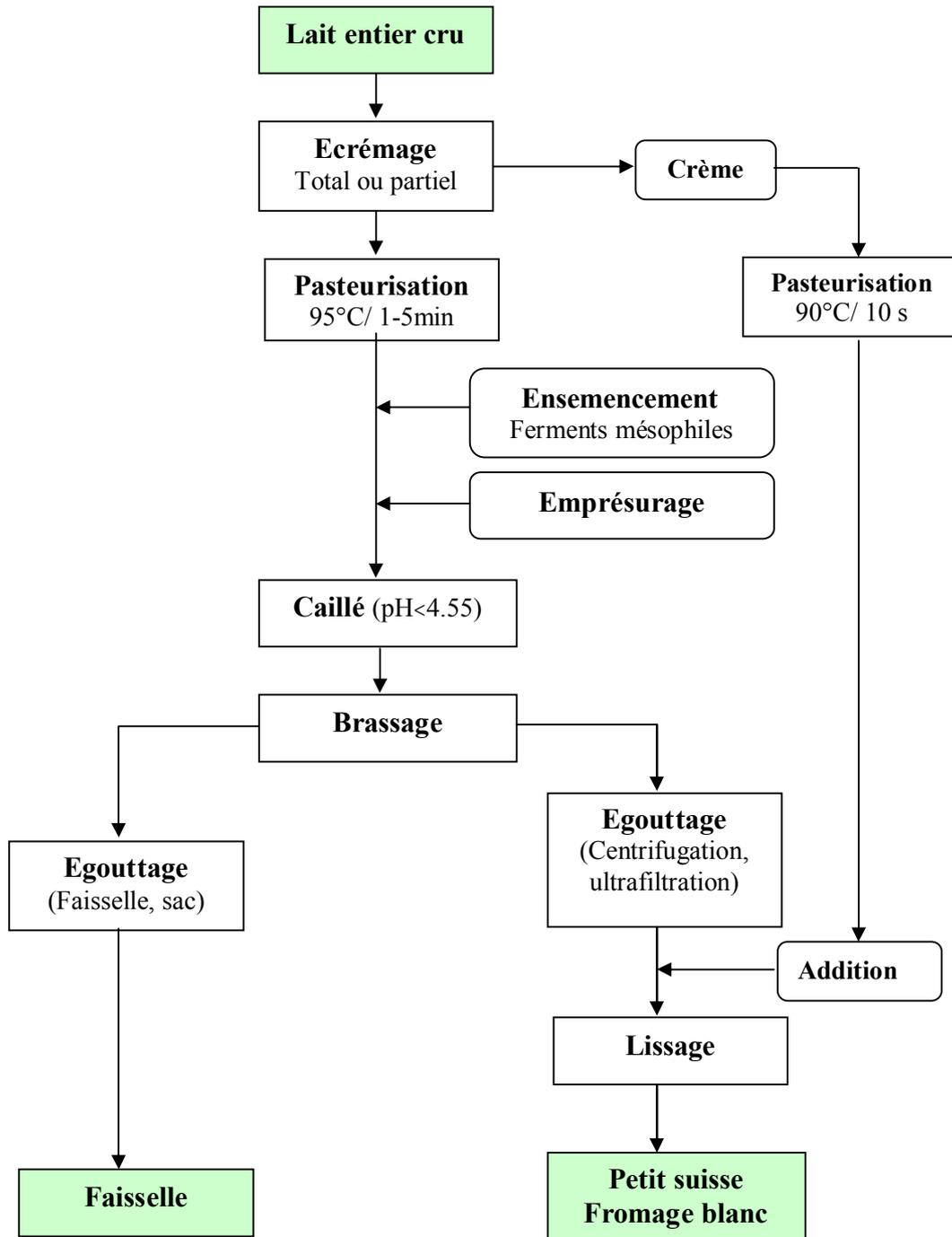


Figure 04 : Schéma générale de la technologie de fabrication des fromages frais (Jeantet et al., 2007).

III.7. Principaux problèmes de fromagerie

La fabrication fromagère repose sur l'utilisation de deux ingrédients complexes et variables : le lait et les ferments. Quant à la présure, son efficacité diminue avec le temps ou dépend des paramètres du milieu. Ces trois facteurs sont à la base même des problèmes de fromagerie aux quels il faut ajouter la complexité, le nombre et la durée des étapes de fabrication (St-Gelais *et al.*, 2002).

L'existence de bactériophages capables de tuer les bactéries lactiques constitue un problème important pour l'industrie fromagère. Le risque le plus élevé d'infection phagique se situe lors de la préparation des ferments, puis lors de l'ensemencement du lait de fromagerie avant la coagulation. Quand les phages deviennent trop abondants dans les ateliers, ils perturbent la fermentation du lait, entraînant une désorganisation de la production. Dans les cas extrêmes, la fabrication peut même devenir impossible, rendant nécessaire un arrêt des fabrications pour une désinfection complète ce qui entraîne des pertes économiques très significatives (Milesi *et al.*, 2007).

III.8. Qualité des fromages

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

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

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

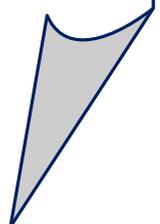
Qualité sensorielle : les qualités organoleptiques conditionnent l'appétence et le plaisir que procure la consommation du produit, elles intègrent la couleur, la texture, l'odeur, la saveur et l'arôme.

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

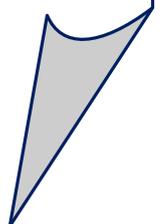
III.9. Rendement fromager

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

Etude Expérimentale



Matériel et Méthodes



II. Matériel et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche de pharmacologie et phytochimie ainsi qu'au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel, durant la période Février – Juillet de l'année 2011.

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

- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir d'un produit de terroir (beurre de chèvre fabriqué traditionnellement) ;
- Etude des aptitudes technologiques de ces bactéries lactiques ;
- Constitution de ferments mixtes mésophiles et étude de leurs propriétés technologiques ;
- Etude des aptitudes probiotiques des ferments mixtes sélectionnés ;
- Application des ferments mixtes sélectionnés dans la fabrication d'un fromage frais au sein du laboratoire.

II.1. Matériel

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

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Le lait

- Deux types de lait cru ont été utilisés lors de cette étude : le lait de chèvre et le lait de vache. Ils ont été collectés au niveau des fermes d'élevage situées dans la région de Jijel, Algérie. Le lait de chèvre a été destiné à la fabrication du beurre traditionnel en laboratoire, afin d'isoler des bactéries lactiques. Alors que le lait de vache a été destiné à la fabrication du fromage frais.

Les échantillons de lait ont été conservés à 4°C jusqu'au moment d'utilisation. Une fois au laboratoire, le pH et l'acidité dornic des échantillons de lait cru ont été déterminés.

- Le lait écrémé en poudre (fourni par l'unité IGILAIT, Jijel) a été utilisé pour quelques tests biochimiques, pour l'étude du pouvoir acidifiant et protéolytique des bactéries lactiques ainsi que pour l'enrichissement du lait de vache.

II.1.1.2. Les souches indicatrices

Il s'agit de cinq souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- *Listeria monocytogenes* ;
- *Bacillus subtilis* ;
- *Staphylococcus aureus* ;
- *Klebsiella sp.* ;
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de l'université de Bejaia.

II.1.1.3. Le ferment industriel et la présure

Le ferment lactique mésophile (LA-5 CHR Hansen) et la présure microbienne (CHYMOSINE, d'une force de 1/10000 tirée de *Aspergillus niger* var. *wamori*) utilisés dans la fabrication du fromage, nous ont été fournis par l'unité IGILAIT, Jijel.

II.1.1.4. Les additifs naturels

Le persil et l'ail, achetés du marché des fruits et légumes (Jijel) ont été utilisés comme suppléments au fromage frais fabriqué.

II.1.1.5. Les segments iléal et du colon

Après le sacrifice d'un poulet de chair, la partie iléale ainsi qu'une partie du colon ont été isolées afin d'étudier la capacité des ferments mixtes à adhérer *in vitro* à ces tissus.

II.1.1.6. Les sels biliaires

Les sels biliaires (Institut Pasteur d'Alger) ont été utilisés pour étudier le pouvoir des bactéries lactiques à résister à cet inhibiteur dans un milieu liquide.

II.1.1.7. Disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques, cinq disques (Institut Pasteur d'Alger) ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide, il s'agit de l'Ampicilline (A 10 μ g), Kanamycine (K 30 μ g), Spiramycine (Sp 100 μ g), Rifampicine (R 5 μ g), et Vanomycine (VA 30 μ g).

II.1.2. Milieux de culture

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

- **Les géloses** : MRS (de Man-Rogosa et Sharp), Mueller-Hinton, hypersaccharosé, gélose aux triglycérides, gélose au tellurite, gélose semi-solide au lait citraté, gélose au sang de cheval, gélose Agar au lait, OGA, VRBL.
- **Les bouillons** : MRS, Bouillon hypersalé à 4% et à 6.5% de NaCl, bouillon Môeller à arginine, SFB, Giolitti Contoni.
- **Autres milieux**: Milieu Gibson-AbdelMalek, lait écrémé tournesolé, lait de Sherman à 0.1% et à 0.3% de bleu de méthylène, milieu MEVAG sans sucre.

II.1.3. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- **Les colorants** : Violet de Gentiane, fuschine, cristal violet, teinture de tournesol, bleu de méthylène, phénolphtaléine à 1% ;
- **Les acides et bases** : La soude dornic N/9, la lessive de soude 35%, l'acide borique 40%, l'acide sulfurique 0.1N et 18M, acide chloridrique 2M et 5M, acide borique 18N, acide trichloroacétique (TCA) 5% ;
- **Les réactifs** : Le réactif de Tashiro, réactif de Vogues Proskauer (VPI et VPII), réactif de Kovacks, réactif de Bradford ;
- **Alcool et autres** : Ethanol, lugol, eau oxygénée, sulfate de potassium, Sulfate de cuivre, caséine, acides aminés (tyrosine, D-L phénylalanine, leucine, cystéine, glycine), sucres (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, tréhalose, adonitol, tergitol, inositol, raffinose, sorbose, mannose, cellobiose et dextrine), trypsine, albumine sérique bovine (BSA).

II.1.4. Tampons

La réalisation de la présente étude a nécessité les tampons suivants :

- Solution de Ringer, pH 7.0 ;
- Tampon PBS, pH 7.2 ;
- Tampon citrate de sodium 1% ;
- Tampon phosphate 1M (K_2HPO_4 ; KH_2PO_4) ;
- Tampon phosphate urée sulfate magnésium, pH 6.5 ;
- Tampon phosphate de sodium, pH 7.0 ;

II.1.5. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Agitateur électrique (Bunsen) ;
- Autoclave (Shiavax Electronic) ;
- Bain Marie (Mettler) ;
- Balance (Denver) ;
- Balance analytique (Kerns 220.4N) ;
- Centrifugeuse électrique (Hettich) ;
- Compteur de colonies (Funk Gerber) ;
- Etuves (Mettler) ;
- Four à moufle ;
- Four Pasteur (Controls) ;
- Micropipettes (Microlit) ;
- Microscope optique (Motic) ;
- pH mètre (Hanna) ;
- Réfrigérateur (Condor) ;
- Spectrophotomètre (UV Shimadzu, Jasco UV630) ;
- Vortex électrique (MS2 Minishaker).

II.2. Méthodes

II.2.1. Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre

Le beurre de chèvre a été choisi comme un produit de terroir faisant objet pour l'isolement des bactéries lactiques.

II.2.1.1. Fabrication du beurre au laboratoire

Le beurre a été fabriqué à partir du lait cru de chèvre selon la méthode traditionnelle : le lait a été placé dans un récipient propre et laissé à la température ambiante trois jours pour le déclenchement d'une fermentation spontanée. Cette fermentation qui aboutit à la formation d'un lait caillé appelé localement « Raïb », est suivie d'un barattage durant 40 minutes. Une quantité d'eau tiède est ajoutée afin de favoriser le rassemblement des grains de beurre. Enfin, le beurre est récupéré, le liquide obtenu est appelé « Lben ».

II.2.1.2. Isolement et purification des bactéries lactiques

II.2.1.2.1. Préparation des dilutions décimales

Pour la préparation, 2.5g de l'échantillon est placé dans un tube stérile contenant 2.1 ml d'eau physiologique stérile et incubé à 45°C jusqu'à fusion. La séparation des deux phases est ensuite réalisée par centrifugation pendant 10 minutes à 3500 rpm.

A l'aide d'une pipette stérile 1ml de la phase aqueuse est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, ainsi s'obtient la dilution 10^{-2} . Les dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-6} sont obtenues de la même manière (Idoui et al., 2009).

II.2.1.2.2. Isolement et purification des isolats

L'isolement a été réalisé sur gélose MRS préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de Pétri, en portant quelques gouttes des dilutions 10^{-4} et 10^{-5} à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 h à 48h en conditions d'anaérobiose.

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (Idoui et al., 2009).

II.2.1.3. Identification des bactéries lactiques isolées

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997), Idoui et Karam (2008) et Gusils et al. (2010) :

II.2.1.3.1. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

II.2.1.3.2. Tests physiologiques et biochimiques

- a. **Recherche de la catalase :** La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.
- b. **Croissance à différentes températures :** Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 39°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.
- c. **Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :** La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Mœller à arginine a été

ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

- d. Production d'acétoïne :** Pour réaliser ce test, du lait écrémé stérile (à 9%) a été réparti en tubes. Chaque tube reçoit une culture à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24 h et vérification de la coagulation, 5 gouttes des deux réactifs VPI et VPII ont été ajoutés à chaque tube positif, suivi d'une agitation intense. Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l' α -naphthol (VPI) en donnant un complexe rouge.
- e. Culture sur lait de Sherman :** Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant.
- f. Culture sur milieu hypersalé :** La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.
- g. Recherche de la réductase :** Le milieu est préparé à partir du lait écrémé stérile préparé lui-même à raison de 12% additionné de teinture du tournesol jusqu'à l'obtention d'une couleur violette, le pH est ajusté à 7.3. L'ensemencement est effectué à partir d'une culture dense de la souche étudiée, suivie d'une incubation à 37°C pendant 3 à 5 jours.
Ce milieu permet d'observer plusieurs types de réaction:
- Attaque du lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au rouge);
 - Attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu);
 - Peptonisation de la caséine après ou en dehors de toute coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulant);
 - Réduction du colorant (décoloration).
- h. Recherche de type fermentaire :** Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié a été ensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface.

L'incubation est faite à 37°C pendant 7 jours. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube.

- i. Recherche de la citratase :** Cette enzyme a été mise en évidence par culture sur gélose semi solide au lait citraté. La gélose a été ensemencée en masse et incubée à 37°C pendant 3 à 5 jours. La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu, c'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et acétoïne.
- j. Test d'hémolyse :** Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné.
Les streptocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies); β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié).
- k. Résistance au tellurite :** La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, la gélose à 0.4% de tellurite de potassium par les souches lactiques à tester. Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires.
- l. Profil fermentaire des sucres :** Ce test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter quelques sucres. Pour ce faire, le milieu MEVAG sans sucre additionnés des sucres à étudier a été ensemencé en masse par les cultures bactériennes. Une couche suffisante de l'huile de vaseline stérile a été versée à la surface du milieu pour favoriser l'anaérobiose. Après 24h d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre testé.

Pour chaque milieu utilisé, un témoin sans sucre ensemencé par les souches est utilisé. Ce test a été réalisé sur 15 sucres qui sont : glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, tréhalose, adonitol, tergitol, inositol, raffinose, sorbose, mannose, cellobiose et dextrine.

II.2.2. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées

II.2.2.1. Pouvoir acidifiant

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

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

L'acidité est déterminée par la formule :

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

Où :

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

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

II.2.2.2. Pouvoir protéolytique

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

II.2.2.3. Pouvoir lipolytique

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière a été coulée et solidifiée. Des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de cette gélose, puis chaque disque reçoit 10 μ l d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant deux jours, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (Guiraud, 2003).

II.2.2.4. Pouvoir texturant

II.2.2.4.1. Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée : Les souches à tester ont étéensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifiée. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (Leveau et al., 1991).

II.2.2.4.2. Quantification de la production des exopolysaccharides : La quantification des exopolysaccharides (EPS) a été réalisée par la technique décrite par **Mozzi et al. (2001)** et **Wu et al. (2010)** : pour chaque souche, 100 ml du bouillon MRS a été inoculé par la culture à tester à raison de 1%. Après une incubation de 24h, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 20min. A un volume de surnageant, deux volumes de l'éthanol à 4°C ont été ajoutés, le tout a été incubé pendant une nuit à 4°C.

Les précipités ont été récupérés par centrifugation à 6000 rpm pendant 5min et resuspendus dans 2ml d'eau distillée. Le mélange précipité-eau a été filtré sur un millipore de 0.22 μ m de porosité. Ensuite, 40 μ l du phénol à 80% et 2ml de l'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à chaque 800 μ l du filtrat suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 490nm (DO₄₉₀), les résultats sont exprimés en grammes des EPS par litre (g/l).

Le taux de sucre est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage tracé avec du glucose.

II.2.3. Constitution d'un levain mésophile

II.2.3.1. Etude des interactions

Le choix des ferments mixtes repose sur l'étude des interactions entre les bactéries lactiques. On les classe en deux catégories : les interactions *positives* qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions *négatives* qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Choisy et al., 1997).

Six (6) souches de bactéries lactiques déjà identifiées ont été choisies pour réaliser ce test, deux souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (codées C18 et C26), une souche de *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* (codées C23), deux souches de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* (codées C24 et C27) et une souche de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (codées C20).

Pour se faire, la méthode décrite par Fleming et al. (1975) a été utilisée. Les souches à tester ont étéensemencées en touche sur la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée. On laisse sécher à température ambiante et, en parallèle, on inocule 7ml de la gélose MRS déjà fondue et refroidie à 39°C par 0.5ml de la souche indicatrice, le mélange est ensuite coulé à la surface de la gélose MRSensemencée en touches.

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition par contre l'antagonisme se traduit par la présence de ces dernières après une incubation à 37°C pendant 24h. Les souches ayant une symbiose entre elles ont été choisies pour la reconstitution de nos ferments mésophiles mixtes.

II.2.3.2. Etude de quelques aptitudes technologiques des ferments mésophiles reconstitués

Les ferments reconstitués (F1 composé de : *Lc. lactis* ssp *lactis* C18 et *lactis* ssp *diacetylactis* C23, F2 composé de *Lc. lactis* ssp *cremoris* C24 et *Ln. mesenteroides* ssp *cremoris* C20) ont été soumis à une évaluation de leurs aptitudes technologiques fromagères :

II.2.3.2.1. Pouvoir coagulant et acidifiant

Pour réaliser ce test, 100ml du lait écrémé stérile a été inoculé par 3ml de ferment. Après une incubation à 37°C pendant 24h, on mesure le volume de lactosérum exsudé et on note l'aspect du coagulum obtenu (Bourgeois et Leveau, 1991). Le pouvoir acidifiant et la mesure du pH ont été déterminés selon la technique déjà décrite en II.2.2.1. Pouvoir acidifiant.

II.2.3.2.2. Pouvoir épaississant

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

II.2.3.2.3. Pouvoir aromatisant

La capacité des ferments mixtes à produire des composés aromatisants au cours de processus de fermentation peut être mise en évidence sur lait écrémé. Pour ce faire, chaque tube contenant du lait écrémé stérile a étéensemencé par un des ferments.

Après incubation pendant 24h et coagulation du lait, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VP II ont été ajoutés et laissés reposer. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge.

II.2.3.2.4. Pouvoir protéolytique

a. Caractère protéolytique sur milieu MRS au lait : L'étude du pouvoir protéolytique des ferments mixtes est réalisée par la même technique déjà décrite en **II.2.2.2**.

b. Caractère protéolytique sur milieu Agar au lait : L'activité protéolytique des exoprotéases et des endoprotéases a été testée par modification de la méthode décrite par **Thivierge (1999)**, c'est la méthode des puits sur milieu Agar au lait :

- **Mesure de l'activité protéolytique des exoprotéases :** L'extrait enzymatique a été préparé par modification de la méthode de **Roudj et al. (2009)** : des cultures bactériennes jeunes (âgées de 18h) ont été centrifugées à froid à 9600 rpm/ 6min et les surnageants sont récupérés puis soumis à différentes conditions : à la température ambiante pendant 30min, la chaleur 65°C pendant 10min et au froid jusqu'à la congélation.

Après avoir coulé et solidifier le milieu agar-lait, des puits ont été confectionnés, le fond de chaque puits est soudé par le même milieu. Après solidification complète, chaque puits reçoit 25µl du surnageant. Le caractère protéolytique est estimé par mesure des halos clairs autour de chaque puits après une incubation à 37°C pendant 24h.

En parallèle, la trypsine a été utilisée comme témoin positif à des concentrations de 0.0002g/ml, 0.0005g/ml, 0.001g/ml, 0.003g/ml, 0.006g/ml, 0.012g/ml, 0.025g/ml, 0.05g/ml, 0.1g/ml, 0.2g/ml.

- **Mesure de l'activité protéolytique des endoprotéases :** L'extrait enzymatique a été préparé par modification de la méthode de **Desmazeaud et Vassal (1979)** : après une centrifugation à froid des cultures jeunes à 9600 rpm/ 6min, les culots ont été lavés deux fois, le premier lavage avec du tampon phosphate de sodium (pH 7.0), et le deuxième avec le même tampon en ajoutant des billes. Le surnageant ainsi récupéré est traité puis testé, en appliquant la même technique décrite avec la mesure de l'activité des exoprotéases.

L'activité protéinasique est déterminée en mesurant le diamètre de l'auréole d'hydrolyse obtenue. Elle est exprimée en unité trypsique/ml.

c. Détermination de l'activité spécifique

- **Détermination de la concentration en protéines totales :** Les extraits enzymatiques des exoprotéases et endoprotéases ont été préparés selon les méthodes de **Roudj et al., (2009)** et **Desmazeaud et Vassal (1979)** respectivement, déjà décrites au **II.2.3.2.4.b**.

La concentration en protéines totales est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)** : 5ml de réactif de Bradford est ajouté à 0.5ml du surnageant, le mélange est bien agité à l'aide d'un vortex. Après incubation à 37°C pendant 30min, l'absorbance est mesurée à 595nm. La concentration en protéines est déterminée en mg/ml à l'aide d'une courbe étalon de la BSA.

- **Détermination de l'activité protéasique :** Les mêmes extraits préparés au **II.2.3.2.4.b** ont été utilisés pour déterminer l'activité protéasique des exoprotéases et des endoprotéases.

L'activité protéasique est déterminée par modification de la méthode de **Sutar et al. (1986)** : 0.4ml de caséine (2.5% dans le citrate de sodium 0.02M) est ajouté à 1.5ml de tampon citrate de sodium 1%, puis 0.3ml d'extrait est ajouté. Après incubation au bain marie pendant 30min à 37°C, la réaction est stoppée par addition de 2.6ml de TCA 5%. Ensuite, 0.4ml HCl (2N) est ajouté.

Après congélation, une centrifugation à 6000 rpm/10min est faite et l'absorbance des surnageants est mesurée à 280nm. L'activité protéasique est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de tyrosine en U/ml qui correspond à l'activité en mg/ml/30min.

- **Détermination de l'activité spécifique :** L'activité spécifique est mesurée par le nombre d'unité d'activité protéasique par mg des protéines contenues dans un ml d'extrait selon la formule suivante (**Desmazeaud et Vassal, 1979**) :

$$\text{Activité spécifique (U/mg)} = \text{Activité enzymatique (U/ml)} / \text{Protéines totales (mg/ml)}$$

II.2.4. Etude des aptitudes probiotiques des ferments mixtes reconstitués et des souches pures

Cette partie est consacrée à l'étude de quelques propriétés probiotiques des ferments mixtes reconstitués (**F1** composé de : *Lc. lactis ssp lactis* C18 et *lactis ssp diacetylactis* C23, **F2** composé de *Lc. lactis ssp cremoris* C24 et *Ln. mesenteroides ssp cremoris* C20) et des souches pures qui leur constituent.

II.2.4.1. Tolérance à l'acidité

L'aptitude des ferments lactiques mixtes et les souches pures à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par **Hydrominus et al. (2000)** :

Avant de réaliser ce test, chaque ferment a été préparé en triple par culture sur bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min, puis les cellules ont été suspendues dans 10ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs de pH (pH2, pH2.5 et pH6.5).

La densité optique (DO₆₆₀) de chaque culture et le nombre de cellules viables ont été déterminés à temps zéro heure (T_{0h}). Les tubes ont été par la suite incubés pendant 2h à 37°C.

La résistance des ferments à ce facteur hostile est estimée par mesure de la densité optique à 660nm et dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution et usage de la cellule de Malassez, après les 2h d'incubation (T_{2h}). Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_{2h} / \log\text{UFC à } T_{0h} \times 100$$

II.2.4.2. Résistance aux sels biliaries

Pour la détermination de l'aptitude des ferments lactiques mixtes et les souches pures à résister à la bile, la méthode décrite par **Hydrominus et al. (2000)** a été appliquée:

Avant de réaliser ce test, chaque ferment a été préparé en triple par culture sur bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min, puis les cellules sont suspendues dans 10ml du bouillon MRS à 0.3 % de sels biliaries et ajusté à différentes valeurs de pH (pH2, pH2.5 et pH6.5).

La densité optique (DO_{660}) de chaque culture et le nombre de cellules viables ont été déterminés à Temps zéro heure (T_{0h}). Les tubes ont été par la suite incubés pendant 2h à 37°C.

La résistance des ferments à ce facteur hostile est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm et dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution et usage de la cellule de Malassez, après les 2h d'incubation (T_{2h}). Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_{2h} / \log\text{UFC à } T_{0h} \times 100$$

II.2.4.3. Réponse au stimulus stomaco-duodénal

Pour tester la réponse des ferments lactiques mixtes et les souches pures au stimulus stomaco-duodénal lors du passage *in vitro*, la technique décrite par **Vizoso Pinto et al. (2006)** a été appliquée :

À partir des cultures bactériennes d'une nuit, des dilutions (1/10) dans la solution de Ringer ont été réalisées afin de déterminer la densité optique DO_{600} et le nombre de cellules de chaque dilution.

10 ml du bouillon MRS à pH3 a été inoculé par 1 ml de cette suspension bactérienne diluée, suivie d'une détermination de la densité optique DO_{600} et la détermination du nombre de cellules (technique de microdilution et usage de la cellule de Malassez) à temps zéro heure.

Après 1h d'incubation, on ajoute 4ml de sels biliaries reconstitués à raison de 10% et 17 ml d'une sécrétion duodénal synthétique (NaHCO_3 6.4 g/l, KCl 0.239g/l, NaCl 1.28g/l). Après cette préparation finale, les cultures sont incubées à 37°C.

Au cours de cette incubation, on procède au suivi de la survie des cellules, par mesure de la DO_{600} et la détermination du nombre de cellules viable après 1h, 2h et 3h d'incubation.

II.2.4.4. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Ce test consiste à étudier la capacité des ferments à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal et le colon. Pour se faire, la méthode décrite par **Lin et al. (2007)** qui comporte trois étapes, a été impliquée:

II.2.4.4.1. Préparation des cellules épithéliales: Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum ainsi qu'un segment du colon d'un poulet de chair ont été ouvert et laver avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30 min pour être laver.

Par la suite, les tissus ont été repris, laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin (côlon) par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10⁻⁴, cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5x10⁴ cellules/ml.

II.2.4.4.2. Préparation de ferment jeune: Des cultures bactériennes jeunes ont été centrifugées à 6000 rpm/10min et le culot de chaque souche a été récupéré dans 2 ml du PBS suivis d'une observation microscopique (Gx100) pour que le nombre soit approximativement de 10⁸ cellules/ml.

II.2.4.4.3. Réalisation du test : 1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10⁻⁴ de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée (ou cellules du côlon). Après incubation à 37°C pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.

II.2.4.5. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par **Iyer et al. (2010)** : des cultures jeunes de 18h ont été préparées dans le bouillon MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à froid à 12000 rpm/5min suivie de deux lavages successifs puis resuspendu dans 1.2 ml de tampon urée phosphate magnésium (pH 6.5). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1.0 à 450nm (DO_{initiale}).

Ensuite 0.6 ml du xylène a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex pendant 2min. Après 15 min, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale ((DO_{finale}).

La différence de la densité optique est considéré comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante:

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \frac{\text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}}}{\text{DO}_{\text{initiale}}} \times 100$$

II.2.4.6. Activité antibactérienne et effet des surnageants

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de cinq souches : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Staphylococcus aureus*.

La méthode des disques décrite par **Tadesse et al. (2004)** a été appliquée : elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller-Hinton par la souche indicatrice (DO₆₆₀ varie entre 0.08 et 0.1). Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10µl d'une culture lactique jeune. Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 4°C pendant 4h, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

L'activité inhibitrice du surnageant natif et celui ajusté à pH 6.5 a été également évaluée par l'application de la technique de diffusion sur gélose décrite par **Barefoot et Klaenhammer (1983)** :

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été soumises à une centrifugation à 9400 rpm/10min, ensuite, les surnageants ont été filtrés sur un millipore de 0.22 μm . Les filtrats ainsi obtenus étaient divisés en deux volumes dont le premier est dit surnageant natif, et le deuxième était ajusté à pH 6.5 avec du NaOH (3N).

Les boîtes de Pétri contenant la gélose Muller Hinton, préalablement coulée et solidifiée, ont été inondées par la souche indicatrice (inoculum standardisé dont la DO_{660} varie entre 0.08 et 0.1), puis des puits ont été confectionnés de 5mm de diamètre, la base de chaque puit a été bouchée par la même gélose. Chaque puit a reçu 25 μl de surnageant. Après incubation 24h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

II.2.4.7. Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée, chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO_{660} varie entre 0.08 et 0.1 puisensemencée par inondation (1 ml) de la surface de la gélose MRS, déjà coulée et solidifiée, l'excès de l'inoculum a été récupéré par une micropipette. Les boîtes ont été laissées sécher à température de laboratoire.

Chaque boîte reçoit cinq (5) disques d'antibiotiques à savoir: Ampicilline (A 10), Kanamycine (K 30), Spiramycine (SR 100), Rifampicine (R 5) et Vanomycine (VA 30). Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Leroy et al., 2007**).

II.2.5. Fabrication d'un fromage frais type salé et persillé et évaluation de sa qualité

II.2.5.1. Technologie de fabrication

Le processus suivi lors de la fabrication du fromage frais est celui décrit par **Eck et Gillis (1979)**.

La méthode de fabrication du fromage frais type salé et persillé est présentée dans la figure 05.

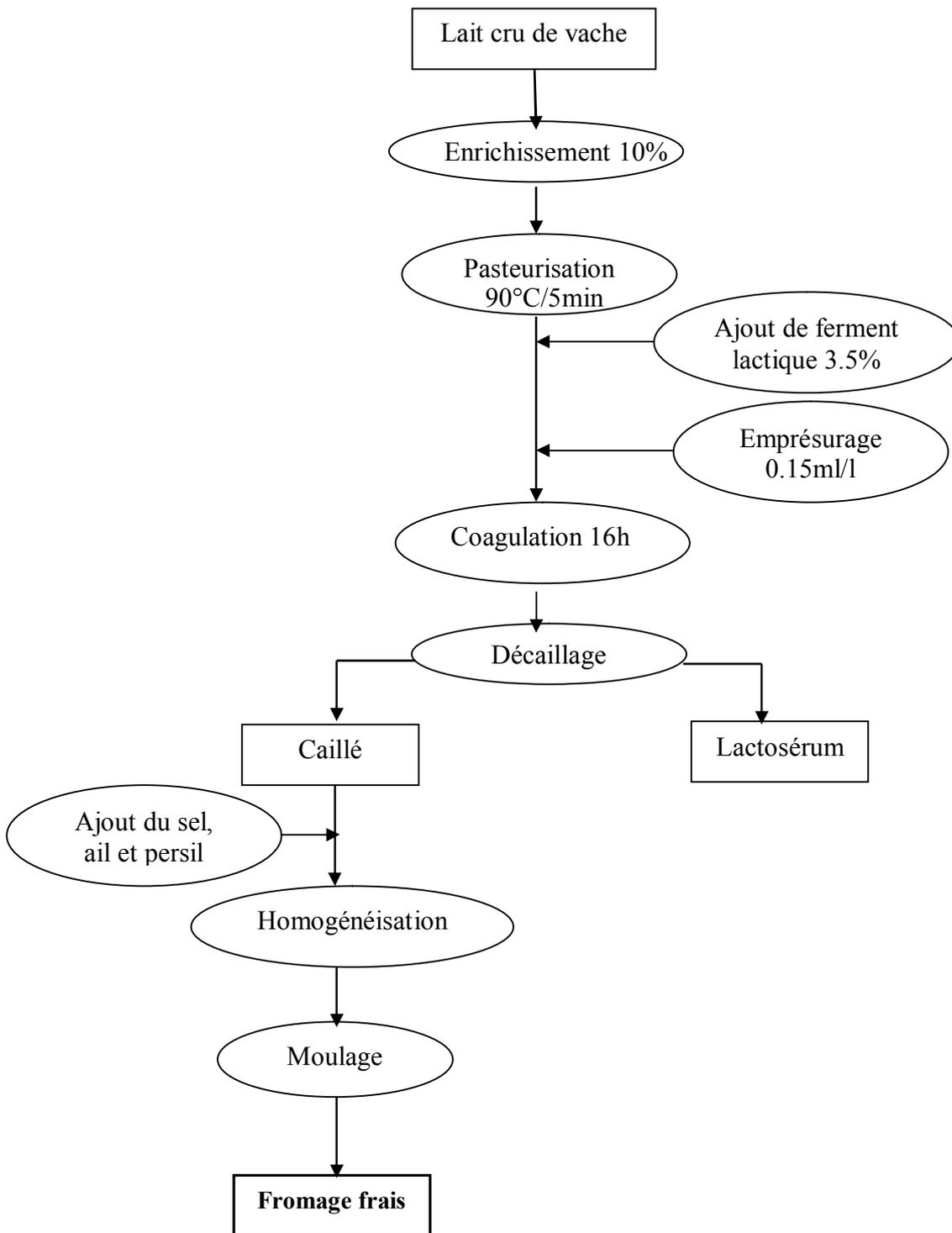


Figure 05 : Diagramme de fabrication du fromage frais type salé et persillé.

II.2.5.1.1. Préparation du lait et des ferments: Une quantité de 4.5 litres de lait de vache cru a été enrichie à raison de 10% avec du lait écrémé en poudre. Après un traitement thermique à 90°C pendant 5 minutes, le volume de lait a été réparti en trois récipients stériles chacun contenant 1.5 litres de lait.

Les cultures d'amorçage ont été préparées par repiquage des cultures lactiques dans du lait écrémé stérile reconstitué à 12%, puis incubés à 37°C pendant 16h. La population estimée est d'environ 10^8 UFC/ml.

II.2.5.1.2. Maturation : Après avoir ramené le lait pasteurisé à la température de 30°C, celui-ci a étéensemencé à raison de 3.5 % par les levains lactiques reconstitués et incubé pendant 4h à 37°C.

II.2.5.1.3. Emprésurage : La présure a été diluée (6.2g/ 100ml) dans de l'eau physiologique, puis ajoutée à une dose de 0.15ml /l et laissée à agir pendant 16h.

II.2.5.1.4. Egouttage : Après la formation d'un caillé (un gel plus ou moins friable) ce dernier a été découpé à l'aide d'un instrument propre et le lactosérum exsudé a été éliminé. Pour faciliter l'égouttage un malaxage énergique a été effectué pendant environ 15 min.

II.2.5.1.5. Ajout d'additifs : Afin d'améliorer le goût de nos fromages, du sel (1g), de l'ail (0.2g) et du persil (0.2g) (pour 100g de caillé) ont été mélangés au caillé et bien homogénéisés.

II.2.5.1.6. Moulage : Le moulage a été réalisé dans des moules en plastiques poreux contenant environ 100g de caillé, et ensuite gardés quelques heures à température ambiante pendant lesquelles des retournements ont été effectués pour accomplir l'égouttage.

II.2.5.1.7. Conditionnement et stockage : Le fromage a été emballé avec du papier alimentaire, étiqueté et conservé à 4°C jusqu'au moment d'usage.

Au cours de cette production, un troisième fromage frais a été préparé en parallèle, en suivant les mêmes étapes de fabrication citées plus haut sauf qu'on a utilisé au lieu de nos ferments sélectionnés, un ferment mésophile industriel. Le fromage obtenu a été considéré comme un témoin pour une comparaison dans le cadre d'évaluer la qualité des deux fromages fabriqués précédemment.

II.2.5.2. Contrôle des fromages frais préparés

La qualité des trois fromages préparés a été évaluée durant une période de 15 jours y compris le jour de fabrication. Des contrôles physico-chimiques, microbiologiques et des analyses sensorielles ont été effectués à J₀, J₇ et J₁₅.

II.2.5.2.1. Contrôle physico-chimique : Cette analyse a comporté la mesure du pH, de l'acidité titrable, la détermination de la composition chimique des échantillons du fromage frais préparé à savoir l'extrait sec total, la matière organique, minérale et les protéines.

a. pH et acidité titrable: 5g de fromage et 30ml d'eau distillée récemment bouillie et refroidie à 20°C ont été introduits dans une fiole conique, le mélange a été bien agité puis laissé au repos pendant 20min. Le pH a été déterminé en utilisant un pH-mètre. Pour la détermination de l'acidité 10ml du produit était prélevé, ajouter de 0.1ml de phénolphtaléine puis titrer avec du NaOH N/9 jusqu'à apparition d'une couleur rose pâle persistante (Amariglio, 1986).

b. Détermination de la matière sèche: Pour la réalisation de cette manipulation, 10g de chaque échantillon a été placé dans des creusets déjà séchés et tarés. Cette préparation a été

placée dans le four Pasteur à 120°C. La matière sèche est déterminée par des pesées répétées jusqu'à avoir un poids constant. Le résultat est exprimé de la manière suivante (**Lecoq, 1965**):

$$\text{MS (\%)} = \text{X/Y} \times 100.$$

Avec :

MS : matière sèche ;
X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;
Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

c. Détermination de la matière minérale: Cette manipulation a été réalisée de la même façon que pour la détermination de la matière sèche, sauf que l'incinération a été réalisée dans un four à moufle réglé à 500°C. Le résultat est calculé de la manière suivante (**Lecoq, 1965**) :

$$\text{MM (\%)} = \text{X/Y} \times 100.$$

Avec :

MM : matière minérale ;
X : poids de l'échantillon en gramme après étuvage ;
Y : poids de l'échantillon en gramme avant étuvage.

d. Calcul de la matière organique : Elle est déterminée en se basant sur les résultats de la matière sèche et minérale en appliquant la formule suivante :

$$\text{MO (\%)} = \text{MS} - \text{MM}.$$

Avec :

MO : matière organique ;
MS : matière sèche ;
MM: matière minérale.

e. Dosage des matières azotées : La détermination de la matière azotée a été effectuée selon la méthode de Kjeldahl (**AOAC, 1997**). Cette méthode de référence est fondée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur de minéralisation (Na_2SO_4 17g/100g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1.5g/100g). Les échantillons (1g) ont été introduits dans des matras de minéralisation, puis minéralisés sur une rampe à 420°C pendant 3 h. Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le produit essentiel de la minéralisation, obtenu par l'ajout de l'acide sulfurique (H_2SO_4). Une base forte (NaOH) est ajoutée selon la réaction suivante:



Au cours de la distillation l'hydroxyde d'ammonium formé (NH_4OH) est entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans un vase de titrage contenant une solution d'acide borique en excès. Le borate d'ammonium formé $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ fait augmenter le pH de la solution. La solution est ensuite titrée par de l'acide sulfurique. Le volume d'acide sulfurique ajouté correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon du départ.

Les résultats sont exprimés en g pour 100 g de fromage selon les formules suivantes et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage d'azote total (% NT) :

$$NT = (V_1 - V_0) \times 0.14 \times 10 / P$$

$$\text{Taux protéines (g/100g fromage)} = 6.38 \times NT$$

Avec:

- V_1 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage de l'échantillon en ml ;
- V_0 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage du blanc en ml ;
- P : masse de l'échantillon du fromage en g ;
- 6.38** : facteur protéique.

II.2.5.2.2. Contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique a été réalisé selon les techniques décrites par **Guiraud et Galzy (1980)**, **Beerens et Luquet (1987)** et **Guiraud (2003)** :

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

b. Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants : Le dénombrement a été réalisé sur gélose VRBL, par ensemencement en masse de 1ml de la dilution 10^{-3} pour les coliformes totaux suivi d'une incubation à $37^\circ C$ pendant 24h et de la dilution 10^{-2} pour les coliformes thermotolérants suivi d'une incubation à $44^\circ C$ pendant 24h. On compte toutes les colonies roses-rouges qui apparaissent après ce temps d'incubation.

c. Dénombrement des levures et moisissures : Le dénombrement a été effectué sur le milieu solide gélosé OGA préalablement coulé et solidifié. 1 ml de la dilution 10^{-3} a été étalé en surface du milieu et les boîtes ont été incubées pendant 3 à 5 jours à une température de $28^\circ C$.

d. Recherche des indologènes : La recherche de cette flore a été réalisée par inoculation de 1ml de la dilution 10^{-3} dans le milieu eau peptonée exempte d'indole. Les tubes ensemencés ont été incubés à $44^\circ C$ pendant 24h. La production d'indole est révélée en ajoutant quelques gouttes du réactif de Kovacs.

e. Recherche de *Staphylococcus aureus* : Le milieu Giolitti Contonii (9ml) a été inoculé par 1g du fromage puis incubé à $37^\circ C$ pendant 24h. Après incubation et s'il y a un noircissement du milieu, la présence de *Staphylococcus aureus* est suspectée, on procède alors à un isolement sur gélose Baird Parker.

f. Recherche de *Salmonella* : Un pré-enrichissement par ensemencement de 1g du fromage dans 9ml du milieu eau peptonée alcaline a été réalisé. Après incubation à $37^\circ C$ pendant 24h, la présence probable de salmonelle se traduit par un trouble du milieu. S'il y a le trouble, un isolement doit être pratiqué sur gélose Hecktoen.

II.2.5.2.3. Analyse sensorielle

Les séances de dégustation des trois fromages frais préparés se sont déroulées dans des conditions non normalisées, par un panel de cinq personnes non entraînés mais habitués à la dégustation de leurs fromages. Ces analyses ont été effectuées à J₀, J₇, J₁₅ après stockage au froid à 4°C.

Les fiches de dégustation sont reproduites en annexes. La note globale intègre l'odeur du produit entier, l'aspect de la croûte et de la pâte, la texture en bouche de la pâte ainsi que la saveur (goût et saveur). Les fiches de dégustation permettent de porter un jugement qualitatif sur les fromages en notant différents descripteurs. Une note globale est finalement attribuée au fromage.

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

II.2.6. Traitement statistique des résultats

Les données expérimentales de l'étude de la résistance à l'acidité, les sels biliaires, l'hydrophobicité des ferments mixtes et les souches pures ainsi que l'analyse sensorielle des fromages frais fabriqués sont statistiquement testées par une analyse de variance (ANOVA). Le logiciel Microcal Origin 6.0 a été utilisé et le seuil de signification de 0.05 a été retenu.

Résultats et discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre

III.1.1. Examen macroscopique et microscopique

Un total de vingt-huit souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. Sur gélose, les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre. Sur bouillant, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques. L'observation microscopique a révélé une seule forme de cellules qui est la forme cocci. Ces coques sont disposées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues.

III.1.2. Tests physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats sont présentées dans le tableau 05. Le tableau 06 regroupe le profil fermentaire des sucres.

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

Parmi la collection des coques, quinze isolats ont montré une capacité à croître à 10°C et 39°C mais pas à 45°C, pourvu d'un caractère homofermentaire et présentant une γ hémolyse. Ils peuvent se développer : à pH 6.5, sur lait de Sherman 0.1% et 0.3%, ainsi que dans un bouillon hyersalé à 4%. La totalité de ces souches présentent une sensibilité vis-à-vis des tellurite et d'azide de sodium. D'après ces caractéristiques, et en se basant sur le test d'ADH, d'actéoïne et le profil fermentaire des sucres, nous les avons subdivisé en espèces et sous espèces du genre *Lactococcus* : huit isolats de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (C05, C07, C10, C12, C14, C19, C24, C27) n'hydrolysent pas l'arginine (ADH), trois isolats de *Lc. lactis* ssp. *lactis* (C03, C18, C26) sont ADH⁺ et actéoïne⁻, trois isolats codés C09, C22 et C23 sont ADH⁺ et actéoïne⁺. La souche C08 a été identifiée en tant que *Lc. raffinolactis*.

En comparant le profil des sucres (tableau 06), nous remarquons qu'une même espèce de bactéries lactiques peut présenter des biotypes différents. Les souches de *Lactococcus* ont pu fermenter le glucose, le galactose, le lactose, le tréhalose et le cellobiose, mais la production d'acide à partir du xylose, d'adonitol, du tergitol et de l'inositol a été négative. Quelques souches fermentent différemment certains sucres à savoir l'arabinose, le raffinose, le sorbose et le saccharose.

Les neuf souches codées C01, C02, C04, C06, C13, C15, C16, C25 et C28, identifiées comme étant *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* sont caractérisées par leur capacité à croître à 45°C mais pas à 10°C, n'hydrolysant pas l'arginine et ne produisant pas l'actéoïne. Ce sont des bactéries homofermentaires, non hémolytiques, sensibles plus ou moins aux colorants et au tellurite. Ces espèces fermentent le glucose, le galactose, le lactose, le mannose, le cellobiose, et à moindre degré, le raffinose, l'arabinose, la dextrine, le saccharose et le sorbose. Elles sont incapables de dégrader le xylose, l'adonitol, l'inositol et le tergitol.

Les quatre isolats caractérisés de mésophiles et hétérofermentaires ont été rattachés au genre *Leuconostoc*. Ces souches sont capables de se développer à pH 6.5 et en milieu hypersalé à 4% et n'hydrolysent pas l'arginine. Trois d'entre eux sont considérés comme *Leuconostoc mesenteroides*

ssp. *cremoris*, il s'agit des biotypes **C17**, **C20** et **C21**. Ces espèces ont la particularité de produire de l'actéoïne et du gaz à partir du citrate, de fermenter différemment certains sucres (lactose, glucose, galactose, l'arabinose, dextrine, tréhalose), mais pas le xylose et le sorbose. La souche **C11** actéoïne et citratase négatifs semble être l'espèce *Leuconostoc lactis*.

Tableau 05 : Profil physiologique et biochimique des souches isolées.

Caractères																						
	souche	Gram	Forme	Catalase	Croissance à 10°C	Croissance à 39°C	Croissance à 45°C	Type fermentaire	Croissance en NaCl		ADH	Actéoine	Lait de Sherman				Réductase	Citratase	Hémolyse	Résistance au tellurite	Croissance à pH6.5	Culture à 0.02% d'azide de Na
									4%	6.5%			0.1%		0.3%							
													R	C	R	C						
C01	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C02	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C03	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	γ	-	+	-	
C04	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C05	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C06	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C07	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	v	+	γ	-	+	-	
C08	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	γ	-	+	-	
C09	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C10	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C11	+	Coc	-	+	+	-	Hét	+	-	-	-	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C12	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	-	+	+	+	+	v	-	γ	-	+	-	
C13	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C14	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	γ	-	+	-	
C15	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	+	v	-	γ	-	+	-	
C16	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	γ	-	+	-	
C17	+	Coc	-	+	+	-	Hét	+	-	-	±	+	+	+	+	-	+	γ	-	+	-	
C18	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	+	±	+	+	+	-	+	-	γ	-	+	-	
C19	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	+	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C20	+	Coc	-	+	+	-	Hét	+	-	-	-	+	+	+	-	v	+	γ	-	+	-	
C21	+	Coc	-	+	+	-	Hét	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	γ	-	+	-	
C22	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	γ	-	+	-	
C23	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	γ	-	+	-	
C24	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	±	+	+	+	-	+	-	γ	-	+	-	
C25	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	
C26	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	±	±	+	+	+	+	+	-	γ	-	+	-	
C27	+	Coc	-	+	+	-	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	γ	-	+	-	
C28	+	Coc	-	-	+	+	Hom	+	-	-	-	+	+	+	-	v	-	γ	-	+	-	

+: test positif ; - : test négatif ; ± : résultat intermédiaire ; v : variable ; Coc : cocci ; Hom : homofermentaire ; Hét : hétérofermentaire ; R : réduction ; C : coagulation.

Tableau 06 : Profil fermentaire des souches isolées.

Sucre	Xylose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Glucose	Galactose	Mannose	Sorbose	Inositol	Lactose	Saccharose	Tréhalose	Dextrine	Cellobiose	Tergitol
Souche															
C01	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C02	-	-	-	±	+	+	+	±	-	+	±	-	±	+	-
C03	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	-	+	-
C04	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C05	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C06	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	-	+	-
C07	-	±	-	±	+	±	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C08	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C09	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C10	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C11	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	±	+	-
C12	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C13	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C14	-	±	-	±	+	+	+	±	-	+	±	+	+	+	-
C15	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C16	-	-	-	±	+	+	+	±	-	+	±	+	+	+	-
C17	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C18	-	-	-	-	+	+	+	±	-	+	±	+	+	+	-
C19	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C20	-	±	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
C21	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C22	-	±	-	+	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C23	-	±	-	-	+	+	+	+	-	+	±	+	+	+	-
C24	-	±	-	+	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C25	-	±	-	±	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C26	-	±	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C27	-	±	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-
C28	-	±	-	-	+	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-

+ : test positif ; - : test négatif ; ± : résultat intermédiaire.

La répartition des vingt-huit isolats de bactéries lactiques isolées du beurre de chèvre et appartenant aux trois genres est la suivante : *Lactococcus* (53.74%), *Streptococcus* (32.14%) et *Leuconostoc* (14.28%). Cependant, l'identification selon les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques nous a permis de mettre en place une collection représentée par sept espèces de bactéries lactiques dont leur distribution selon le pourcentage d'apparition est illustrée par la figure 06.

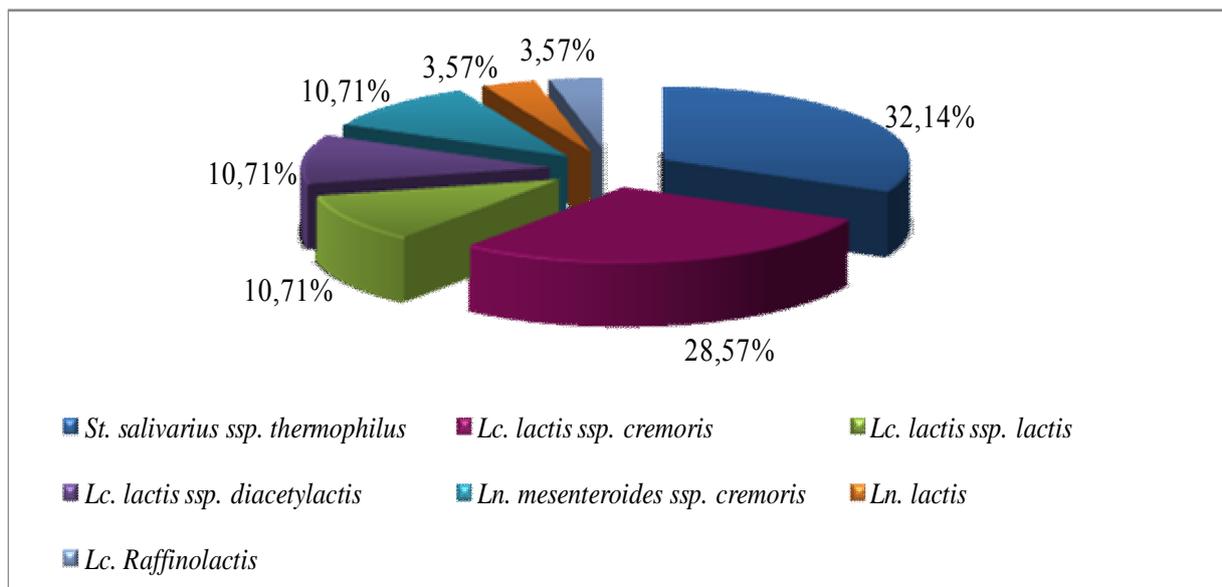


Figure 06 : Répartition des espèces de la collection lactique (%).

A partir de cette figure 06, nous pouvons noter que *St. salivarius ssp. thermophilus* est la sous-espèce dominante des souches isolées avec un pourcentage de 32.14%, suivie en deuxième ordre de la souche *Lc. lactis ssp. cremoris* avec un pourcentage de 28.57%. Les sous-espèces *Lc. lactis ssp. diacetylactis*, *Lc. lactis ssp. lactis* et *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* occupent une proportion de 10.71%, suivie par les espèces *Lc. raffinolactis* et *Ln. lactis* avec un faible pourcentage de 3.57%.

Il n'y avait pas assez de recherche en ce qui concerne l'isolement des bactéries lactiques à partir du beurre de chèvre traditionnel, mais il existe d'autres parts des travaux ayant porté sur le lait de chèvre. Les travaux de **Badis et al. (2005)** effectués sur le lait cru de chèvre de deux populations caprines Algériennes (Arabia et Kabyle), ont montré une prédominance du genre *Lactobacillus* (61.48%) dans la population Kabyle, alors que les genres *Leuconostoc* (32.64%) et *Lactococcus* (31.02%) dominent la population Arabia.

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

Beerens et Luquet (1987) et **Guiraud et al. (1998)** ont rapporté qu'il existe un transfert des microorganismes, dont les bactéries lactiques, du lait vers le beurre. Ainsi, le beurre contient d'origine des bactéries lactiques à taux élevé provenant d'une multiplication lors de la maturation du lait.

La présence des espèces de *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris*, *Lc. lactis ssp. diacetylactis*, et *Leuconostoc* dans le beurre offre la possibilité d'utiliser cette gamme de microorganismes comme inoculum (levain) dans les produits laitiers.

III.2. Aptitudes technologiques des isolats de bactéries lactiques

III.2.1. Pouvoir acidifiant

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 07, 08, 09 et 10. Les résultats chiffrés de l'évolution du pH sont résumés dans l'annexe.

D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Après deux heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH6.35 et pH6.67, en parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 1.45g et 2.35g d'acide lactique par litre de lait. Au bout de 24h d'incubation ces valeurs de pH diminues et se trouvent situées entre pH4.80 et pH5.30, de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 4.7g/l et 7.7g/l.

Les espèces *Ln. lactis*, *Lc. lactis ssp. lactis* et *Lc. raffinolactis* étaient les plus acidifiantes avec une quantité d'acide lactique moyenne de 6.5 g/l, 6.46g/l et 6.42g/l respectivement après 24h d'incubation. Un maximum de 7.2g/l d'acide lactique a été produit par la sous espèces *Lc. lactis ssp. lactis* C18 après 24 h d'incubation. En parallèle, les valeurs de pH atteintes avec ces souches oscillent entre pH4.83 et pH5.17. Une moyenne de 6.27g/l d'acide lactique est produite par les souches de *Lc. lactis ssp. cremoris*. La cinétique d'acidification a montré que les souches *Lc. lactis ssp. diacetylactis*, *St. salivarius ssp. thermophilus* et *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* étaient moins acidifiantes en produisant des quantités variables d'acide lactique dont les moyennes sont de 5.93g/l, 5.83g/l et 5.73g/l respectivement.

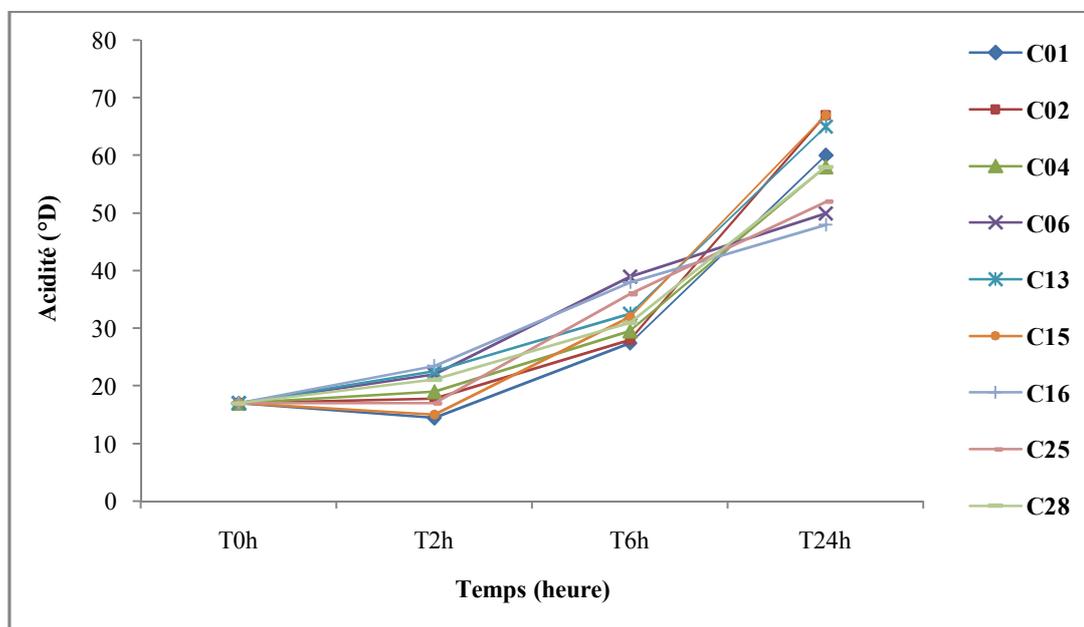


Figure 07 : Production d'acide lactique par les souches *St. salivarius ssp. thermophilus* codées C01, C02, C04, C06, C13, C15, C16, C25 et C28.

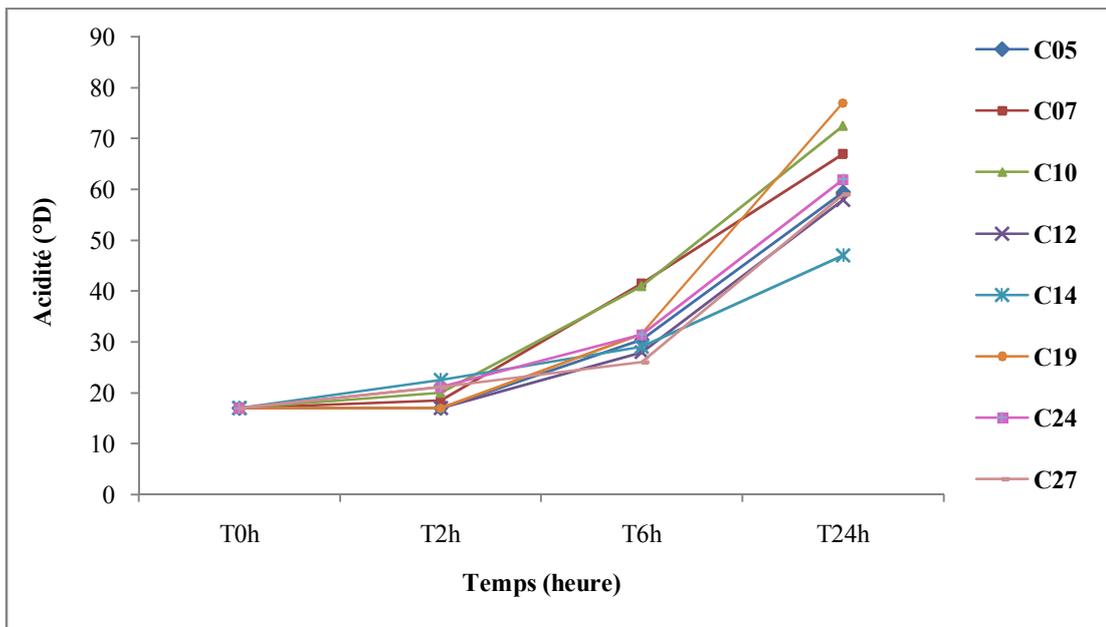


Figure 08 : Production d'acide lactique par les souches *Lc. lactis ssp. cremoris* codées C05, C07, C10, C12, C14, C19, C24 et C27.

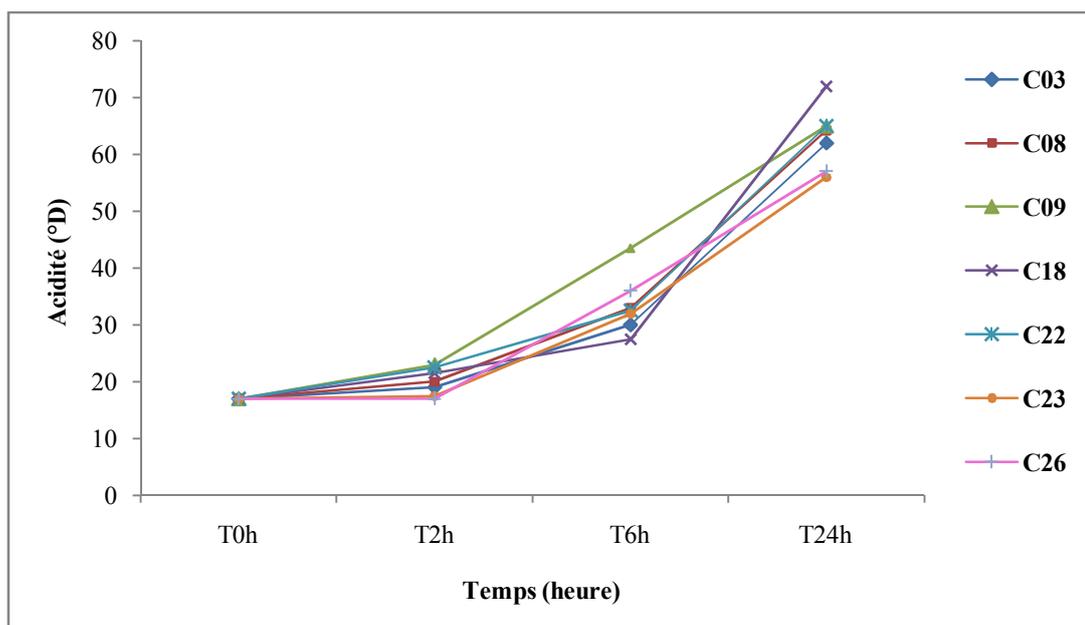


Figure 09 : Production d'acide lactique par les souches *Lc. lactis ssp. lactis* codées C03, C18, C26, *Lc. lactis ssp. diacetylactis* codées C09, C22, C23 et *Lc. raffinolactis* C08.

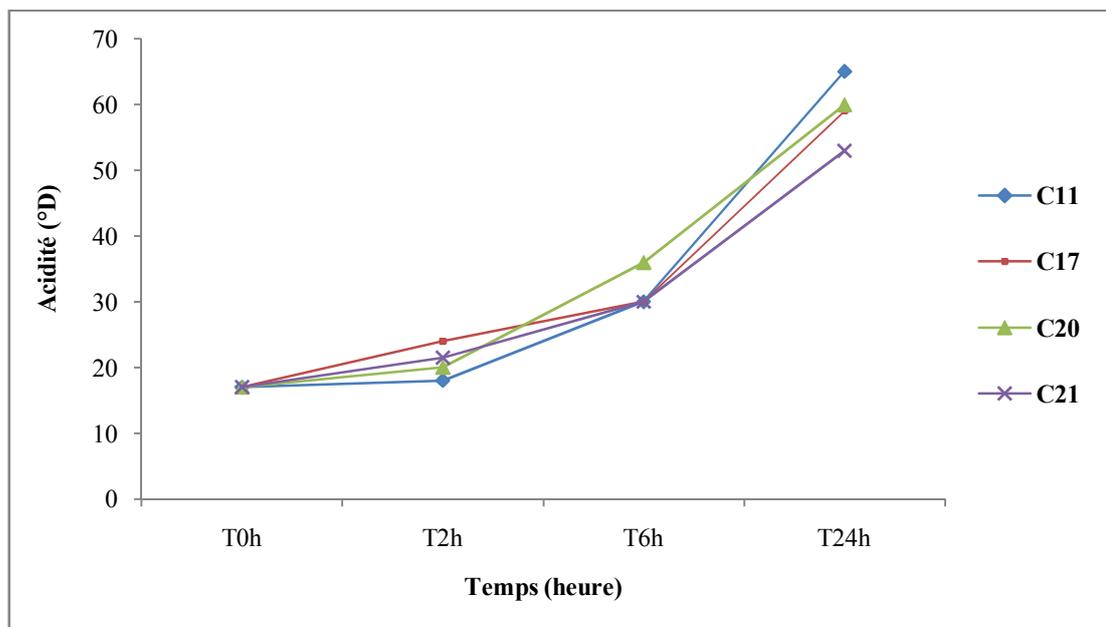


Figure 10 : Production d'acide lactique par les souches *Ln. lactis* C11 et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* codées C17, C20, C21.

L'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce, vérité scientifique et logique rapportée par **Luquet et Corrieu (2005)**.

Nos résultats ne se concordent pas et ceux de **Idoui et al. (2009)**, qui ont trouvé que les *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Ln. lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* produisent des quantités en acide lactique supérieures à 8.5g/l après 24h d'incubation. Par contre **Cheriguene et al. (2006)** ont rapporté une activité acidifiante plus faible des espèces de *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, isolées à partir du lait de chèvre, de l'ordre de 6g/l d'acide lactique et pour *Lc. lactis* ssp. *lactis* une moyenne de 7.5g/l après 24h d'incubation.

Roukas et Kotzekidou (1998) ont travaillé sur la production d'acide lactique à partir de lactosérum en culture pure et mixte de *Lactococcus lactis*. Ils ont montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture mixte (22.5g/l) alors qu'en culture pure la concentration est de l'ordre de 10.5g/l. De même **Mangia et al. (2008)**, ont étudié la cinétique d'acidification de la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* CFM7 isolée à partir du lait de brebis et ont trouvé qu'après 24h, cette souche, produit 7.2g/l d'acide lactique.

III.2.2. Pouvoir protéolytique

Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le tableau 07. Il en ressort du tableau que toutes les souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques.

Selon **Vuillemand (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 9 et 15mm.

Il apparaît clairement que l'espèce *Lc. lactis* ssp. *lactis* est fortement protéolytique comparativement aux autres espèces avec une moyenne de 14.33mm de diamètre, suivi de *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* et *Lc. raffinolactis* avec des zones d'hydrolyse de 12mm. *St. salivarius* ssp. *thermophilus* ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* ont montré des diamètres de 11.67mm, 11.38mm et 11mm respectivement. Alors que l'espèce *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* est jugée la moins protéolytique avec un diamètre de 10.33mm.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel, présentent un caractère protéolytique.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (**Savoy et Hébert, 2001** ; **Hassaïne et al., 2007**).



Photo 01 : Activité protéolytique sur milieu MRS au lait.
(1) : *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 ; (2) : *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ;
(3) : *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 ; (4) : *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24.

Tableau 07 : Activité protéolytique des isolats de bactéries lactiques.

Espèces	Obsrevation	Diamètre (mm)	Moyenne selon l'espèce
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C01	Croissance avec protéolyse	13	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C02	Croissance avec protéolyse	11	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C04	Croissance avec protéolyse	12	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C06	Croissance avec protéolyse	11	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C13	Croissance avec protéolyse	14	11.67 ± 1.41
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C15	Croissance avec protéolyse	10	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C16	Croissance avec protéolyse	13	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C25	Croissance avec protéolyse	10	
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C28	Croissance avec protéolyse	11	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C05	Croissance avec protéolyse	9	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C07	Croissance avec protéolyse	13	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C10	Croissance avec protéolyse	11	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C12	Croissance avec protéolyse	12	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C14	Croissance avec protéolyse	10	11.38 ± 1.69
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C19	Croissance avec protéolyse	14	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C24	Croissance avec protéolyse	12	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C27	Croissance avec protéolyse	10	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C03	Croissance avec protéolyse	15	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C18	Croissance avec protéolyse	13	14.33 ± 1.15
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C26	Croissance avec protéolyse	15	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C09	Croissance avec protéolyse	13	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C22	Croissance avec protéolyse	13	12.00 ± 1.73
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C23	Croissance avec protéolyse	10	
<i>Lc. raffinolactis</i> C08	Croissance avec protéolyse	12	12.00 ± 0.00
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C17	Croissance avec protéolyse	9	
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C20	Croissance avec protéolyse	11	10.33 ± 1.15
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C21	Croissance avec protéolyse	11	
<i>Ln. lactis</i> C11	Croissance avec protéolyse	11	11.00 ± 0.00

III.2.3. Pouvoir lipolytique

Les résultats de l'activité lipolytique des souches lactiques sont reportés dans le tableau 08. D'après ces résultats, il apparaît que l'ensemble des bactéries lactiques ne présente pas une activité lipolytique sauf quelques sous-espèces qui sont révélées positives en formant des dépôts autour des disques de croissance. Il s'agit des *St. salivarius* ssp. *thermophilus* codée C02, C06, C16 et C28 ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* codée C24 et C27, *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* codée C9 et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C21.

Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par **Crow et al.(1994)** qui ont montré que les lactocoques possèdent une faible activité lipolytique. Les travaux de **Fernandez et al. (2000)**, ont

montré que l'activité estérasique n'était pas nécessaire à la croissance des bactéries lactiques ni dans un milieu synthétique, ni dans du lait écrémé ou entier.

Tableau 08 : Activité lipolytique des isolats de bactéries lactiques.

Espèces	Obsrevation	Evaluation du test
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C01	Croissance sans dépôt	–
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C02	Croissance avec dépôt	++
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C04	Croissance sans dépôt	–
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C06	Croissance avec dépôt	+++
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C13	Croissance sans dépôt	–
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C15	Croissance sans dépôt	–
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C16	Croissance avec dépôt	+
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C25	Croissance sans dépôt	–
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C28	Croissance avec dépôt	+
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C05	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C07	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C10	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C12	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C14	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C19	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C24	Croissance avec dépôt	+
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C27	Croissance avec dépôt	+
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C03	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C18	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C26	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C09	Croissance avec dépôt	+
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C22	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C23	Croissance sans dépôt	–
<i>Lc. raffinolactis</i> C08	Croissance sans dépôt	–
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C17	Croissance sans dépôt	–
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C20	Croissance sans dépôt	–
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C21	Croissance avec dépôt	++
<i>Ln. lactis</i> C11	Croissance sans dépôt	–

III.2.4. Pouvoir texturant

La quantification des EPS produits a porté sur les espèces présentant des résultats positifs sur la gélose hypersaccharosée. L'ensemble des résultats est illustré dans le tableau 09.

Ce test a montré que toutes les souches étudiées à l'exception de *St. salivarius* ssp. *thermophilus* codée C01, C02, C15, C16 ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* codée C07 et C10 et *Lc. raffinolactis* C08, sont capables de se développer sur un milieu hypersaccharosé en formant des colonies à aspect plus ou moins gluant témoignant une production d'un agent épaisissant, les exopolysaccharides (photo 02).

Sur milieu MRS, la quantité la plus élevée des EPS produite est de 1.94g/l obtenu avec *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C17 et la plus faible est celle produite par *Lc. lactis* ssp. *lactis* C26 de l'ordre de 0.86g/l. La photo 03 montre très clairement le précipité sur les parois des tubes.

Nos résultats sont proches de celui de **Pan et Mei (2010)**, qui ont obtenu un rendement entre 950.48 mg/l et 4790 mg/l de souches des *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* 12.

Tableau 09 : Production de polysaccharides par les bactéries lactiques.

Espèces	Obsrevation	Evaluation du test	Quantité des EPS (g/l)
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C01	Colonies normales	-	-
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C02	Colonies normales	-	-
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C04	Colonies larges et gluantes	+	1.42
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C06	Colonies larges et gluantes	+	1.25
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C13	Colonies larges et gluantes	+	1.48
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C15	Colonies normales	-	-
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C16	Colonies normales	-	-
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C25	Colonies larges et gluantes	+	1.04
<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> C28	Colonies larges et gluantes	+	1.37
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C05	Colonies larges et gluantes	+	1.28
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C07	Colonies normales	-	-
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C10	Colonies normales	-	-
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C12	Colonies larges et gluantes	+	1.31
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C14	Colonies larges et gluantes	+	1.36
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C19	Colonies larges et gluantes	+	1.47
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C24	Colonies larges et gluantes	+	1.16
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C27	Colonies larges et gluantes	+	1.18
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C03	Colonies larges et gluantes	+	1.41
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C18	Colonies larges et gluantes	+	1.39
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C26	Colonies larges et gluantes	+	0.86
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C09	Colonies larges et gluantes	+	1.31
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C22	Colonies larges et gluantes	+	1.18
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C23	Colonies larges et gluantes	+	1.18
<i>Lc. raffinolactis</i> C08	Colonies normales	-	-
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C17	Colonies larges et gluantes	+	1.94
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C20	Colonies larges et gluantes	++	1.41
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C21	Colonies larges et gluantes	+	1.31
<i>Ln. lactis</i> C11	Colonies larges et gluantes	+	1.28



Photo 02 : Aspect des colonies sur milieu hyersaccharosé



Photo 03 : Production des EPS par les bactéries lactiques

Ces observations rejoignent celles de **Bouzar et al. (1997)** qui avaient constaté que l'espèce *Lc. lactis* est capable de produire des EPS, en culture pure comme en association avec *St. thermophilus*. Ainsi, **Looijesteijn et al. (2001)** ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents. Ces auteurs ont pu identifier des souches productrices d'EPS (voire très fortement) et des souches non productrices sans que ce caractère n'engendre des disparités de croissance.

La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (**Walling et al., 2001**). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS dans les ferments lactiques lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse. Il a été montré que les EPS produits par *St. salivarius* et *St. mutans* sont impliqués dans la colonisation bactérienne et la formation de plaque dentaire (**Cerning, 1990**).

Hassan et al. (2005) ont démontré que l'utilisation de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* JFR1, souche productrice d'EPS, dans la fabrication de fromage (le cheddar) prévient la réduction de sa rigidité durant sa maturation.

III.3. Interactions entre les bactéries lactiques et reconstitution de ferments mésophiles

Il est assez rare que l'on utilise pour la fabrication des produits laitiers une seule souche de bactéries lactiques. En règle générale, on associe plusieurs souches, voir plusieurs espèces et genres bactériens (**Juillard et al., 1987**).

Dans le but de reconstituer un ferment mixte mésophile, l'étude des interactions entre les souches lactiques semble être une étape primordiale. Ce type de test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches de même espèce ou d'espèce différente, une fois mise en contact. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

En analysant ces résultats, nous pouvons constater que la majorité des souches lactiques mésophiles testées peuvent être symbiotiques avec les souches lactiques de la même collection où la plupart des interactions sont apparues positives. L'exemple le plus significatif de la symbiose est celui de *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18, qui n'exerce aucune activité inhibitrice à l'encontre de toutes les espèces

testées. Par contre, la souche *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C27 a montré une activité inhibitrice la plus remarquable vis-à-vis des espèces de *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 et *Lc. lactis* ssp. *lactis* C26.

Tableau 10 : Interactions entre les bactéries lactiques.

Souches	C18	C20	C23	C24	C26	C27
C18	.	+	+	+	+	+
C20	+	.	+	+	+	-
C23	+	+	.	-	+	+
C24	+	+	-	.	+	-
C26	+	+	+	+	.	-
C27	+	-	+	-	-	.

+ : symbiose - : inhibition

Ces résultats nous ont aidé à combiner entre les souches lactiques étudiées pour obtenir deux ferments mixtes mésophiles utilisés ultérieurement. La composition en souche des deux ferments **F1** et **F2** est illustrée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Composition en souche des ferments mixtes mésophiles reconstitués.

Ferments	Souches
F1	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C18 + <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> C23
F2	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C24 + <i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> C20

III.4. Quelques aptitudes technologiques des ferments mixtes reconstitués

III.4.1. Pouvoir acidifiant et coagulant

Les résultats de ce test sont groupés dans le tableau 12. Il en ressort du tableau que les deux ferments mixtes ont une activité acidifiante considérable qui se traduit par la production d'acide lactique au cours de l'incubation dont les valeurs atteignent 8.50g/l et 8.15g/l après une incubation de 24h par les deux ferments mixtes codés F1 et F2 respectivement.

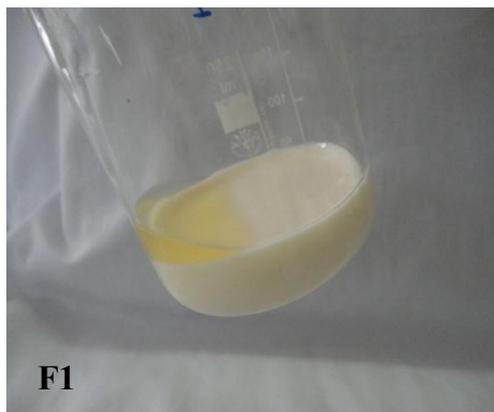
De même, il apparaît que la production d'acide est accompagnée par une chute de pH dont les valeurs enregistrées après la même phase d'incubation sont de l'ordre de pH 4.90 et pH 4.93 pour les ferments F1 et F2 respectivement.

Tableau 12 : Pouvoir acidifiant des ferments mixtes sélectionnés (g/l d'acide lactique).

Ferments	T0h après ensemencement		Après 2h d'incubation		Après 6h d'incubation		Après 24h d'incubation	
	pH	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité
F1	6.57	2.10	6.53	2.52	6.38	2.80	4.90	8.50
F2	6.57	2.10	6.56	2.50	6.40	2.70	4.93	8.15

L'activité acidifiante des ferments lactiques est un paramètre déterminant dans leur sélection et leur utilisation (Martley, 1983). Selon Roukas et Kotzekidou (1998), l'abaissement du pH avec les cultures mixtes est généralement plus rapide et plus prononcé, ce qui s'explique par la stimulation d'au moins une des souches de mélange.

La photo 04 montre l'aspect des deux gels lactiques formés après ensemencement par nos ferments mixtes F1 et F2 et une incubation de 24h. Il apparaît clairement que les deux gels montrent une bonne consistance et fermeté avec le peu de lactosérum. Cette qualité de gel est très demandée en industrie de fromage frais pour laquelle le gel à coagulation lactique dominante soit ferme et peu tenace.

**Photo 04** : Aspect du gel formé par les ferments mixtes F1 et F2.

III.4.2. Pouvoir épaississant

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

La photo 05 montre l'aspect des gels formés après fermentation par les ferments mixtes F1 et F2. Nous avons pu noter un aspect épais et dense des coagulums, ces derniers, lorsqu'ils s'écoulent à travers les parois des tubes présentent une viscosité élevée.

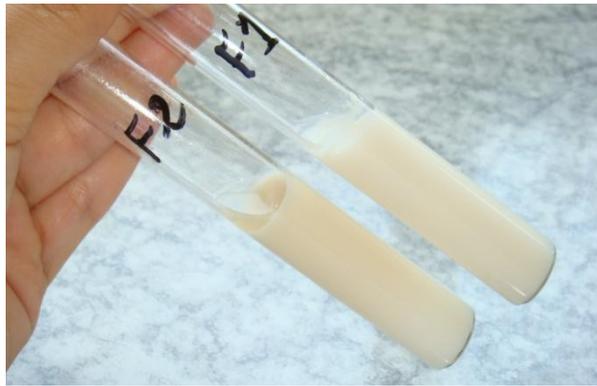


Photo 05 : Aspect des gels formés sur lait saccharosé.

D'après **Béal et al. (2008)**, certaines bactéries lactiques sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS) dont l'accumulation provoque une augmentation de la viscosité des milieux. Cependant, aucune relation n'a pu être établie entre la viscosité et la quantité des EPS mesurée pour une culture.

Selon **Lin et Chien (2007)**, la production des EPS dépend des bactéries lactiques et de la durée de la fermentation. **Chamba (2008)** a rapporté que les lactocoques comme les *Leuconostocs* sont capables de produire des EPS, ce caractère est généralement porté par un plasmide. Cette propriété des bactéries lactiques est largement exploitée dans la fabrication des fromages consommés à l'état frais car elle limite la synérèse. En revanche, pour la fabrication des fromages à forte teneur en matière sèche (pâtes pressées et cuites), l'emploi de souches produisant des EPS est à éviter.

III.4.3. Pouvoir aromatisant

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. D'après la photo 06, il apparaît que les deux ferments mixtes F1 et F2 arrivent à produire des arômes (acétoïne) dont l'anneau rouge le témoigne, donc ils ont un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés.

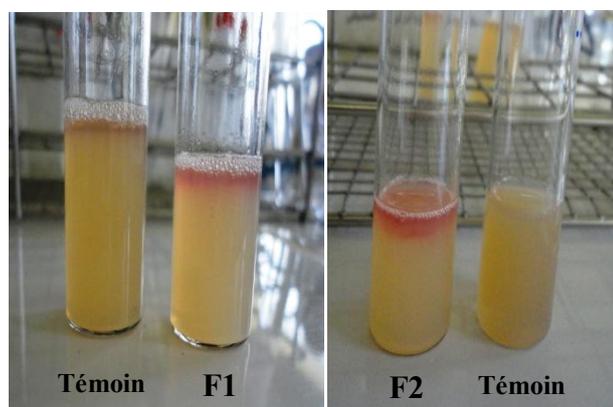


Photo 06 : Production de l'acétoïne par les ferments mixtes F1 et F2.

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont

capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α - acétolactate (Raynaud et al., 2003 ; Leroy et De Vuyst, 2004).

De nombreux auteurs ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyl et/ou en acétoïne (Monnet et al., 2008). D'après Phalip et al. (1994), l'acétoïne est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique.

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

III.4.4. Aptitude protéolytique des ferments mixtes

III.4.4.1. Caractérisation de l'activité protéolytique

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

Sur le milieu MRS au lait, les deux ferments mixtes F1 et F2 ont montré un bon pouvoir protéolytique comparativement aux souches individuelles qui les composent dont la photo 07 le montre clairement. Les diamètres des zones d'hydrolyse étaient de l'ordre de 25mm pour le ferment F1 et de 32mm pour le ferment F2.



Photo 07 : Activité protéolytique des ferments F1 (1) et F2 (2) sur milieu MRS au lait.

Dans un second temps, nous avons voulu tester cette aptitude sur un autre milieu (l'Agar au lait) afin de caractériser les enzymes protéolytiques qui y sont responsables. Pour se faire, des extraits enzymatiques, représentant les exo et les endoprotéases à partir des ferments mixtes et les souches pures, ont été préparés.

Les extraits enzymatiques que nous avons soumis aux différents traitements à savoir la chaleur et le froid, ont montré une activité protéolytique reflétée par des zones de protéolyse autour des puits sur la gélose au lait (photo 08), donc ces extraits ont la capacité d'hydrolyser les caséines du lait. Les résultats de ce test sont groupés dans les tableaux 13 et 14 pour les exoprotéases et les endoprotéases respectivement.

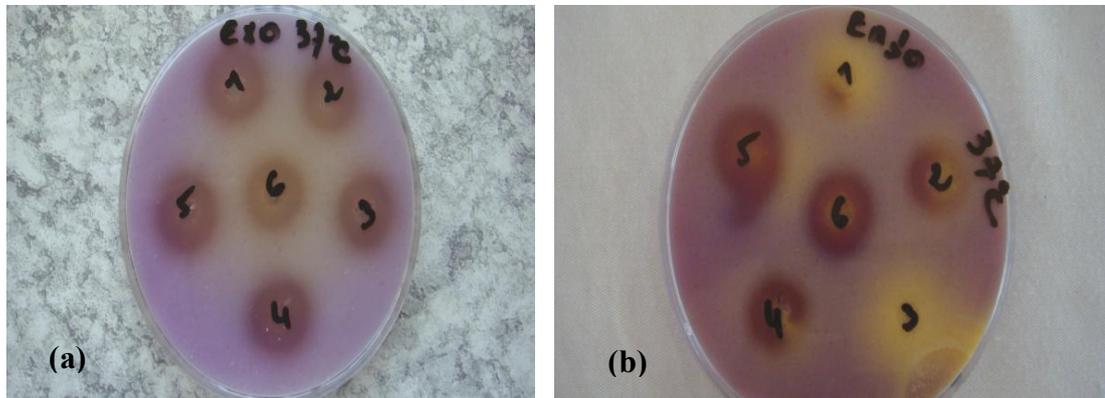


Photo 08 : Zones de protéolyse sur milieu Agar au lait des exoprotéases (a) et endoprotéases (b).
 (1) : *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 ; (2) : *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ; (3) : *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 ; (4) :
Lc. lactis ssp. *cremoris* C24 ; (5) : ferment mixte F1 ; (6) : ferment mixte F2.

D'une manière générale, il apparaît que l'activité protéinasique des extraits enzymatiques (des exo et des endoprotéases) soumis au traitement thermique et au froid est remarquablement faible par rapport à cette activité dans les conditions normales.

Dans les conditions normales, les exoprotéases des ferments mixtes F1 et F2 ont montré une activité protéolytique de 0.1 U trypsique. Cependant les souches pures présentent des activités protéinasiques moins importantes (entre 0.006 et 0.05 U trypsique) sauf chez *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 qui a présenté une activité allant de 0.1 à 0.2 U trypsique.

En effet, l'activité protéinasique des extraits enzymatiques des exoprotéases soumis à un traitement thermique semble être affectée par ce dernier où des valeurs comprises entre 0.0005 U trypsique pour le ferment F1 et 0.025 U trypsique pour le ferment F2 ont été enregistrées.

De même, pour les extraits enzymatiques des exoprotéases traités par le froid, les valeurs varient entre 0.006 U trypsique pour *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et 0.1 U trypsique pour *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23.

Tableau 13 : Activité protéinasique des exoprotéases sur milieu Agar au lait.

Activité protéinasique U trypsique (g/ml)			
Souche	Natif	Chaleur	Froid
C18	0.025	0.006	0.012
C20	0.006-0.012	0.001	0.006
C23	0.1-0.2	0.012	0.1
C24	0.025-0.05	0.006-0.012	0.05
F1	0.1	0.0005	0.025
F2	0.1	0.012-0.025	0.05

En ce qui concerne les endoprotéases, les résultats obtenus avec les extraits enzymatiques dans les conditions normales sont sensiblement plus importants et meilleurs. Les extraits des souches de *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 ont une activité comprise entre 0.05 et 0.1 U trypsique, alors que ceux de *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ont donné une activité supérieure à 0.2 U trypsique.

Tableau 14 : Activité protéinasique des endoprotéases sur milieu Agar au lait.

Activité protéinasique U trypsique (g/ml)			
Souche	Natif	Chaleur	Froid
C18	> 0.2	0.0005	0.0005
C20	> 0.2	0.025	0.0005
C23	0.05	0.001	0.003
C24	0.05-0.1	0.003	0.0005
F1	0.1-0.2	0.012	0.05
F2	0.1	0.025	0.003

Par comparaison aux extraits traités par la chaleur et le froid, l'activité protéinasique de ces derniers a connu une diminution nette dont les valeurs oscillent entre 0.0005 et 0.05 U trypsique (tableau 14).

La technique à l'agar au lait est une méthode simple et rapide permettant de mesurer l'activité protéinasique des bactéries lactiques, bien qu'il soit parfois difficile de mesurer précisément l'auréole formée par la souche bactérienne.

Les résultats obtenus montrent également qu'il existe une variation aussi bien qualitative que quantitative de l'activité protéinase entre les souches d'une même espèce. Il est bien établi que l'activité protéolytique des bactéries lactiques étudiées est sensible aux variations de la température.

Une étude conduite par **Thivierge (1999)** sur *Lc. lactis* ssp. *cremoris* en utilisant la même technique dans les conditions normales, a montré l'existence d'une activité de 0 à 0.0013 U trypsique. De ce fait, nos souches sont plus performantes avec une activité qui peut atteindre 0.2 U trypsique.

L'effet de la température sur l'activité protéinase de *Lc. lactis* ssp. *lactis* LB12 a été étudié par **Guo et al. (2009)**. Ils ont enregistré une perte de 50% d'activité à 30°C et une perte de 70% à 60°C après une incubation de 30min. **Fernandez de Palencia et al. (1997)** ont estimé une perte totale d'activité protéinase à 50°C pour des souches de *Lb. casei* ssp. *casei* IFPL731.

III.4.4.2. Détermination de l'activité spécifique des exoprotéases

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15. L'analyse de ces valeurs montre que la concentration en protéines totales varie de 0.004 à 0.011mg/ml et l'activité protéasique se situe entre 0.016 et 0.094 U/ml.

Après le calcul de l'activité spécifique, les résultats diffèrent d'une souche à l'autre, où la valeur la plus élevée était 14.75 U/mg chez la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et la plus faible (1.51 U/mg) était obtenue avec *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18. Les deux ferments F1 et F2 ont présenté des activités de l'ordre de 8.54 et 6.76 U/mg respectivement.

Tableau 15 : Activité spécifique des exoprotéases.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
C18	0.011	0.016	1.51
C20	0.004	0.059	14.75
C23	0.008	0.067	8.49
C24	0.009	0.035	3.964
F1	0.011	0.094	8.547
F2	0.011	0.074	6.76

L'activité protéasique des souches isolées par **Thapa et al. (2006)** est plus importante que celle enregistrée avec nos souches. Ces auteurs ont trouvé une activité protéasique de l'ordre de 0.8 U/ml pour *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 0.9 U/ml pour *Lc. lactis* ssp. *lactis* et 0.5 U/ml pour *Ln. mesenteroides*. Alors que **Pescuma et al. (2010)** ont trouvé des valeurs de l'activité protéolytique qui oscillent entre 0.08 U/ml et 0.62 U/ml après 12h d'incubation pour des souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus* sp.

III.4.4.3. Détermination de l'activité spécifique des endoprotéases

Le tableau 16 illustre les résultats de l'activité spécifique des protéases extracellulaires. Il apparaît que la concentration en protéines totales varie de 0.004 à 0.007 mg/ml et l'activité protéasique de 0.005 à 0.025 U/ml pour l'ensemble des extraits des souches pures et des ferments mixtes.

Les meilleures activités spécifiques sont obtenues avec l'extrait de *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ayant une valeur de 4.20 U/mg et celui du ferment F1 avec une valeur de 3.33 U/mg. Alors que l'extrait du ferment F2 a montré l'activité la plus faible (0.97 U/mg).

Tableau 16 : Activité spécifique des endoprotéases.

Souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)
C18	0.005	0.005	1.107
C20	0.006	0.025	4.20
C23	0.006	0.008	1.435
C24	0.004	0.005	1.306
F1	0.007	0.023	3.338
F2	0.006	0.005	0.973

Si nous comparons ces résultats avec celles obtenus avec les exoprotéases, nous pouvons constater que la meilleure activité du complexe protéasique est celui des enzymes exocellulaires.

González et al. (2010) ont testé treize souches de *Lc. lactis* ssp. *lactis* et deux souches de *Ln. mesenteroides* (isolées à partir du fromage traditionnel) pour l'activité spécifique de leur protéases, les résultats ont été situés entre 3.11 U/mg et 1589.27 U/mg. D'autre part, l'étude menée par **Guo et al. (2009)** a montré que l'activité spécifique des protéases liées à la paroi de *Lc. lactis* ssp. *lactis* LB12 était de 0.25 U/mg.

Une caractéristique qui est recherchée pour la reconstitution de ferment appliqué dans la fabrication fromagère est l'activité protéinasique faible, car la présence d'une forte activité a été reliée à la production de peptides amers. Le ferment ne doit cependant pas être seulement composé de souches protéinase négative, car la croissance de celui-ci serait beaucoup trop lente lors de la production fromagère en industrie (**Fox et McSweeney, 1996**).

Le complexe enzymatique des exo et des endoprotéases des bactéries lactiques joue un rôle primordial dans la croissance bactérienne. Les protéases extracellulaires dégradent les caséines en gros peptides qui sont intégrés par les bactéries grâce à des perméases. Là, des peptidases hydrolysent ces peptides en acides aminés qui sont utilisés comme nutriments par la bactérie et sont une source d'arômes (**Nancib et al., 2005**).

III.5. Aptitudes probiotiques des ferments mixtes

III.5.1. Résistance à l'acidité

Il y a eu peu d'études sur l'activité probiotiques des lactocoques, puisqu'on l'a généralement supposé que les lactocoques ne survivent pas lors du passage à travers l'appareil digestif, cela est dû au pH faible de l'estomac et à la présence de sels biliaires dans l'intestin. Cependant, plusieurs travaux récents ont suggéré que les lactocoques puissent survivre pour atteindre l'appareil gastro-intestinal humain ou animal (Kimoto-Nira *et al.*, 2009).

L'étude de l'exposition prolongée des ferments mixtes et les souches individuelles aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par incubation dans le milieu MRS à différents pH pendant 2h.

Les résultats obtenus illustrés par la figure 11 montrent l'existence d'une viabilité continue des ferments mixtes et des souches individuelles dans le milieu MRS à différents pH (pH 6.5, 2.5 et 2). Nous avons pu noter des différences significatives ($P < 0.05$) des taux de survie pour chaque souche.

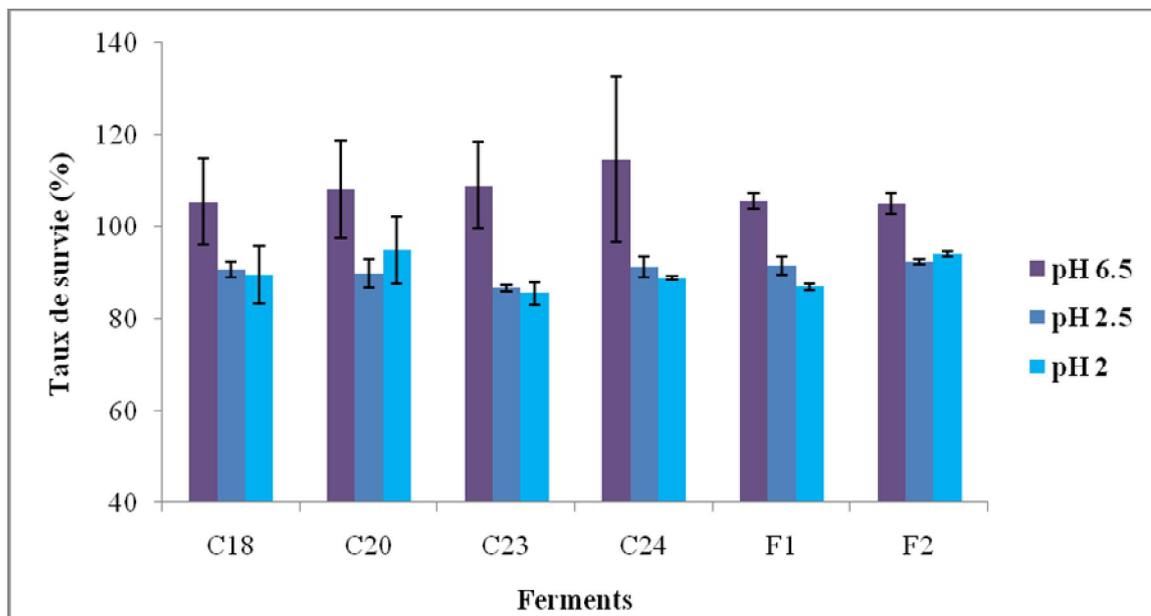


Figure 11 : La résistance des souches pures et des ferments mixtes aux milieux acides.

Les souches pures : *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 ; *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ; *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 ; Ferments mixtes : F1 (C18+ C23) et F2 (C20+ C24).

L'ensemble des souches pures et ferments mixtes ont donné une bonne croissance sur le milieu témoin pH 6.5 (taux de survie est supérieur à 100%) d'où l'élévation du nombre de cellules initial avec un maximum de survie de $114.6 \pm 17.9\%$ enregistré chez *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24.

D'une manière générale, la résistance aux conditions acides diminue avec la diminution du pH du milieu jusqu'à atteindre un minimum de $85.5 \pm 2.3\%$ de viabilité enregistré par la souche *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 à pH 2. Le ferment F2 a montré une meilleure résistance aux bas pH à savoir pH 2.5 ($92.4 \pm 0.6\%$) et pH 2 ($94.1 \pm 0.6\%$).

D'autre part, aucune différence significative n'a été remarquée si on compare les taux de survie des ferments mixtes et les souches qui les composent ($P > 0.05$), c'est-à-dire, le ferment F1 avec les souches codées C18 et C23 et le ferment F2 avec les souches codées C20 et C24.

D'une façon générale, il est bien établi que malgré qu'il y ait eu une perte de la croissance de l'ensemble des bactéries lactiques à pH acide, le nombre de cellules viables reste toujours important et supérieur à 80%. Donc, elles peuvent résister ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac.

Even et al. (2003) ont observé un effet important de l'acidification sur l'activité glycolytique des cellules. En conditions acides, le taux spécifique de consommation de glucose est augmenté, permettant ainsi un plus grand apport d'énergie ce qui permis aux bactéries lactiques de mieux résistées à pH acide.

O'Sullivan et Condon (1997) ont montré une bonne résistance de la souche *Lc. lactis* ssp. *cremoris* NCDO 712 au pH acide dont la survie était de 100% à pH 4 après 2h d'incubation. Ils ont rapporté que la majorité des bactéries lactiques possèdent un mécanisme de tolérance en milieu acide, ils sont capables de survivre à des concentrations en acide létales.

Les résultats d'une étude menée par **McDonald et al. (1990)** révèlent un arrêt de la croissance des souches de *Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum* à pH voisin de 3. D'autre part, les travaux de **Mathara et al. (2008)** ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus* sp. vis-à-vis aux pH 2.5 et pH 2 après 2h d'incubation.

III.5.2. Résistance aux sels biliaires

Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site, de ce fait la tolérance des ferments mixtes et des souches individuelles a été évaluée. Les résultats de ce test sont illustrés par la figure 12.

Il apparaît que les souches pures et les ferments mixtes ont présenté une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaires et à différents milieux acides. Nous avons pu noter une bonne résistance à pH 6.5 qui a été significativement différente ($P < 0.05$) entre les souches lactiques testées. Les valeurs varient entre $101.5 \pm 1.9\%$ pour *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et $94.1 \pm 2.1\%$ pour *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23.

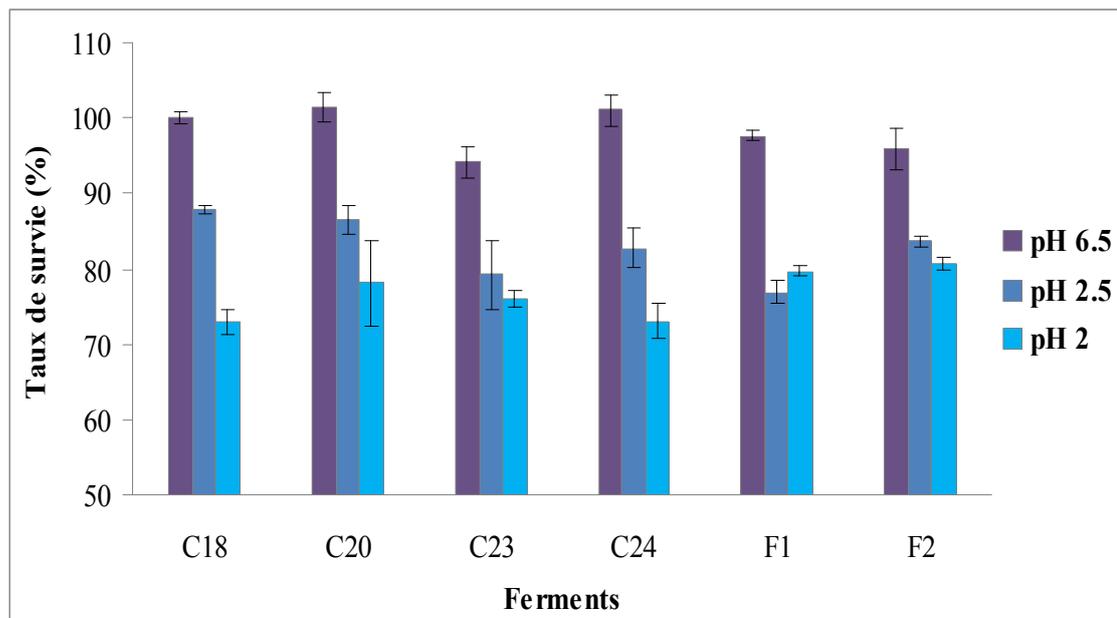


Figure 12 : La résistance des souches pures et des ferments mixtes aux sels biliaries à 0.3%.

Les souches pures : *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 ; *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ; *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 ; Ferments mixtes : F1 (C18+C23) et F2 (C20+C24).

A pH 2.5, le taux de survie a diminué pour atteindre des valeurs comprises entre $87.8 \pm 0.5\%$ pour *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 et $76.9 \pm 1.4\%$ pour le ferment F1, la différence entre les souches était significative ($P > 0.05$). Alors qu'à pH 2, on n'a pas eu une réduction significative du taux de survie par rapport à pH 2.5 et même entre l'ensemble des souches pures et des ferments mixtes, à l'exception de la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 où sa viabilité a diminué d'une façon significative d'un pH 2.5 à pH 2 pour enregistré la valeur la plus faible de $72.9 \pm 1.6\%$.

Il faut noter que l'association des souches n'a pas d'effet significatif sur l'augmentation de la chance de survie des bactéries lactiques testées dans des milieux acides et en présence de sels biliaries, mais la résistance reste importante (supérieur à 70%), ce qui rend possible le passage vivant de ces ferments dans le tractus digestif.

Kimoto-Nira et al. (2009) ont rapporté que les facteurs influençant la résistance des lactocoques à la bile sont associés à la composition du milieu de croissance. Ils ont prouvé que la résistance à la bile de quelques souches de *Lactococcus* a été changée quand le sucre dans le milieu est changé du glucose en lactose. En d'autres termes, l'exclusion de la bile par les bactéries exige de l'énergie. Les hydrates de carbone qui sont facilement ou rapidement métabolisés pour apporter cette énergie, augmentent la résistance aux sels biliaries. D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaries semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire.

Des résultats trouvés par **Burns et al. (2008)** ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaries. De même **Zago et al. (2011)** ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage.

III.5.3. Réponse au stimulus stomaco-duodéal

La figure 13 présente la réponse des ferments mixtes et les souches pures au stimulus stomaco-duodéal. Ces résultats révèlent qu'il y a une résistance de la majorité des ferments mixtes et des souches pures aux conditions défavorables imposées par la composition de ce milieu.

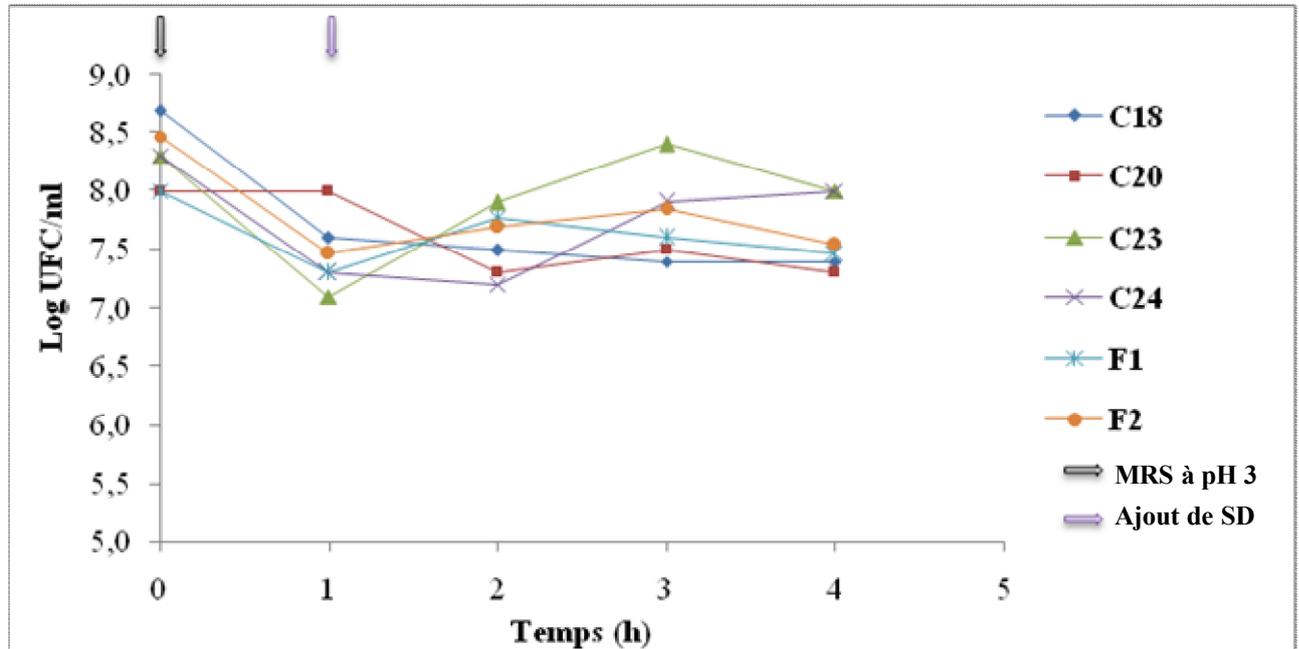


Figure 13 : Réponse des souches pures et des ferments mixtes au stimulus stomaco-duodéal.

Les souches pures : *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 ; *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 ; *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 ; *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 ; Ferments mixtes : F1 (C18+C23) et F2 (C20+C24). SD : Sécrétion duodénale

Il en ressort de la figure 13 que l'ensemble des souches pures mises au test a montré une bonne résistance à pH 3 après 1h d'incubation. La survie était maximale (100%) avec la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et minimale (85.5%) avec la souche *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23. De même, les deux ferments mixtes ont montré une tolérance remarquable de l'ordre de 91.2% pour le ferment F1 et de 88.2% pour le ferment F2.

Après l'ajout des sécrétions duodénales synthétiques au milieu, le comportement des souches pures et des ferments mixtes était variable. Nous avons noté une augmentation du nombre de cellules durant les trois heures d'incubation chez la souche *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24. Alors que la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 a présenté une réduction continue pendant la période d'incubation où le nombre inoculé (8.7 log UFC/ml) a diminué jusqu'à atteindre la valeur 7.4 log UFC/ml.

Le nombre de cellules viables des deux souches codées C20 et C23 et les ferments mixtes F1 et F2, a connu une fluctuation, mais il tend à se réduire après 2h d'incubation.

La tolérance au faible pH ne suffit pas pour prédire la survie d'une souche lors de son passage à travers l'appareil digestif, dans les conditions de l'estomac, l'étude de la tolérance à la bile et le suc pancréatique est aussi importante pendant une période donnée. Le temps de transit peut être variable de 1h, 3h à 4h selon l'individu, l'alimentation et autres conditions, cela peut influencé la viabilité des bactéries probiotiques (Vizoso Pinto et al., 2006).

L'étude conduite par **Vizoso Pinto et al. (2006)** sur trente cinq souches de *Lactobacillus* sp., a révélé la tolérance de sept souches au stimulus stomaco-duodéal avec une survie qui varie entre 11% et 93%.

III.5.4. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Comme l'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales *in vivo* est difficile à réaliser, l'adhésion *in vitro* est le model le plus utilisé (**Gu et al., 2008**). Dans notre étude nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales de poulet de chair).

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 17. Il apparaît que les souches individuelles ont présenté une adhésion aux cellules épithéliales de l'iléum et du colon de poulet de chair, à l'exception de la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 qui n'a montré aucune capacité d'adhésion.

Tableau 17 : Adhésion des ferments mixtes et souches pures aux cellules épithéliales du colon et de l'iléum.

Ferments	Colon		Iléum	
	Test	Lecture	Test	Lecture
C18	-	Absence d'adhésion	-	Absence d'adhésion
C20	+	Adhésion	+	Adhésion
C23	+	Adhésion	+	Adhésion
C24	++	Bonne adhésion	+	Adhésion
F1	+	Adhésion	+	Adhésion
F2	++	Bonne adhésion	+	Adhésion

De même, les ferments mixtes présentent une adhésion aux cellules épithéliales de l'ilium et du colon de poulet de chair. L'adhésion du ferment F2 aux cellules épithéliales du colon est jugée comme bonne.

L'adhésion aux cellules épithéliales humaines est un test important suggéré pour l'évaluation du pouvoir probiotique des souches lactiques (**Schillinger et al., 2005 ; Guglielmotti et al., 2007**). Cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries indésirables et la stimulation du système immunitaire. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixations pour la colonisation (**Robin et Rouchy, 2001**).

D'après certains auteurs, l'origine des probiotiques joue un rôle dans les capacités d'adhérence, il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent adhérer mieux aux muqueuses intestinales de l'homme (**Gu et al., 2008**). Cependant **Kimoto-Nira et al. (2009)** ont constaté que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) isolées à partir de divers produits laitiers, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines.

Wang et al. (2010) ont prétendu que les conclusions tirées des résultats des études *in vitro* ne puissent pas être directement appliquées aux situations *in vivo*. Il a été montré qu'il existe une relation entre la capacité d'adhérence et la colonisation provisoire de l'intestin humain.

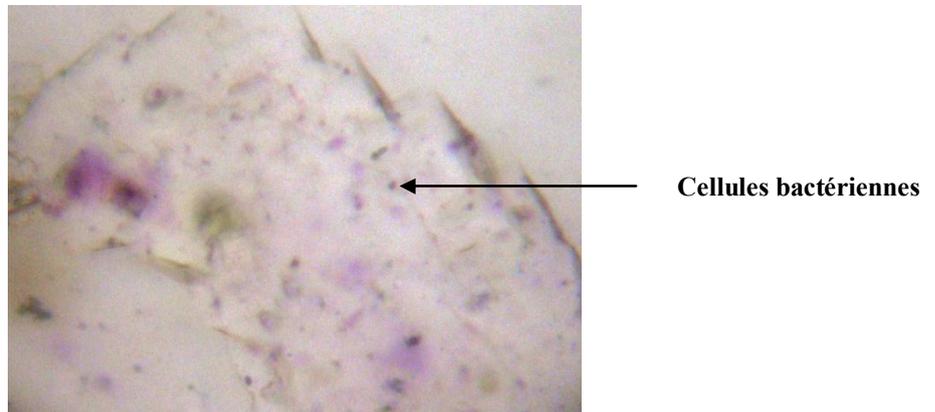


Photo 09 : Test d'adhésion du ferment F2 au tissu épithélial du colon.

III.5.5. Test d'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des ferments mixtes et des souches pures vis-à-vis du xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des ferments aux mucus intestinale.

La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les pourcentages obtenus de l'adhérence des souches pures et des ferments mixtes au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont illustrés par la figure 14.

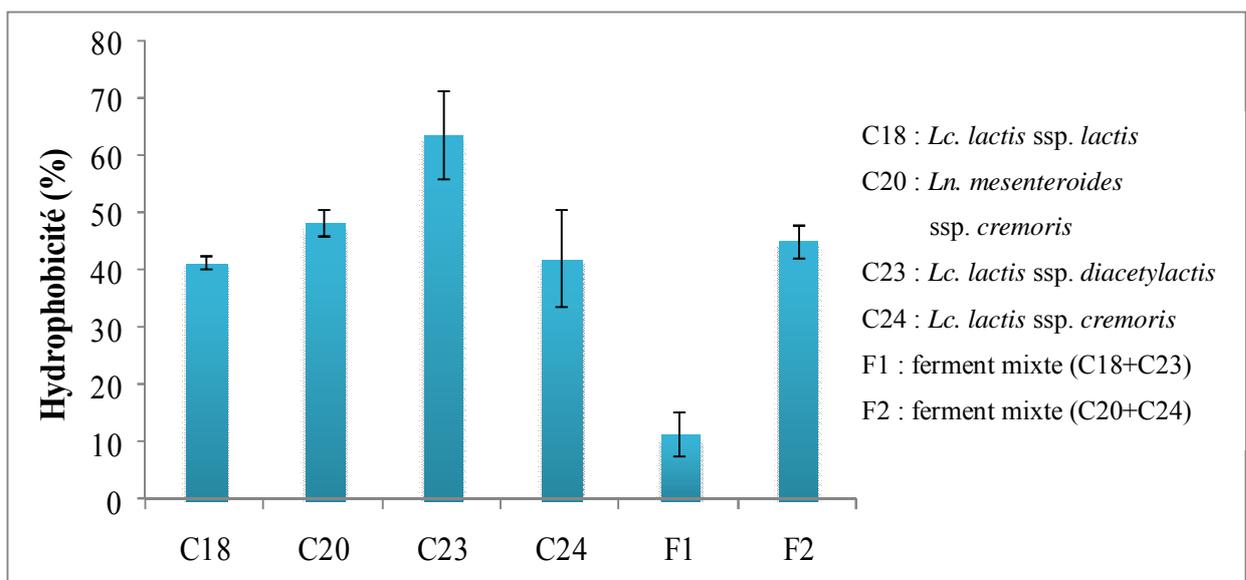


Figure 14 : Hydrophobicité des souches pures et des ferments mixtes.

Ces résultats montrent que les souches mises au test présentent une bonne hydrophobicité, cela témoigne une bonne sélectivité des surfaces membranaires. La valeur la plus élevée (63.58%) est enregistrée avec la souche *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 et la plus faible est celle du ferment F1 (11.37%). La différence enregistrée entre les souches pures et les ferments mixtes, est significative ($P < 0.05$).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Ly-Chatain et al. (2010)** qui ont trouvé une hydrophobicité de 40% pour des souches de *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Tandis que *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* était plutôt hydrophile, avec une adhérence nulle à l'hexadécane. L'hydrophobicité de plusieurs souches de *Lc. lactis* d'origine laitière a été évaluée par **Giaouris et al. (2009)**. Ces derniers ont trouvé des valeurs qui oscillaient entre 5% et 88%.

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Roos et Jonsson, 2002 ; Guglielmotti et al., 2007**).

Une étude conduite par **Iyer et al. (2010)** a montré que l'hydrophobicité de deux streptocoques était de 20 et 24%. D'après les travaux de **Guglielmotti et al. (2007)**, des espèces de *Lactobacillus* ont révélé une hydrophobicité qui varie entre 5% et 63%. Par ailleurs, dans une autre étude réalisée par **Pan et al. (2006)**, l'hydrophobicité de vingt trois souches de *Bifidobacterium* était comprise entre 32% et 37%.

III.5.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des ferments mixtes et des souches pures contre cinq souches pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagonistique. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Activité antibactérienne des ferments mixtes et souches pures sur les germes indicatrices (mm).

Diamètres de zones d'inhibition	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
C18	00	08	13	10	12
C20	11	10	11	16	11
C23	00	00	08	10	08
C24	11	12	11	10	11
F1	00	07	11	11	09
F2	14	08	10	14	12

D'après ces résultats, la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 8

à 13mm, sauf sur *E.coli* où aucune inhibition n'a été obtenue. La souche *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 présentent une nette inhibition des cinq souches tests dont le diamètre des zones d'inhibition est compris entre 10 et 16mm.

L'effet inhibiteur de la souche *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 est faible pour les trois bactéries à gram⁺, *Bacillus subtilis* (8mm), *Listeria monocytogenes* (8mm) et *Staphylococcus aureus* (10mm). Cette souche n'a montré aucune zone d'inhibition à l'encontre d'*E. coli*.

Le ferment F1, comme pour les souches C18 et C23, ne manifeste aucun effet antagonistique vis-à-vis d'*E.coli* qui leur est totalement résistant. Cependant, il présente une activité inhibitrice modérée sur *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes* avec un diamètre de zones d'inhibition situé entre 7 et 11mm.



Photo 10 : Activité inhibitrice des souches pures et ferments mixtes sur *Klebsiella* sp.

Le ferment F2 présente une activité inhibitrice contre *E.coli* comparativement aux souches pures qui le composent. La zone d'inhibition était de 13mm, tandis que les souches pures, *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 donnent des diamètres de zones d'inhibition de 11mm. En revanche, l'inverse est observé avec *B. subtilis* et *Klebsiella* sp. où les souches pures sont les plus efficaces comparativement au ferment mixte (F2). Ce dernier a une bonne activité antagonistique contre *S. aureus* avec un diamètre de 14mm par rapport à la souche *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24 qui le compose (10mm). L'autre souche *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 demeure plus inhibitrice (16mm).

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches pures et ferments mixtes ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à gram positif mais pas tous sur les bactéries à gram négatif. **Onda et al. (2003)** suggèrent que les bactéries gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (**Titiek et al., 1996 ; Aslam et Qazi, 2010**).

Charlier et al. (2009) ont montré que *Lactococcus* sp. et *Leuconostoc* sp. présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

La capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor et al., 2006).

III.5.6.1. Effets des surnageants natifs

Les résultats du tableau 19 illustrent la résistance et la sensibilité des souches testées (*Klebsiella* sp., *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*) aux composants des surnageants natifs des ferments mixtes et des souches pures.

Tableau 19 : Activité inhibitrice des surnageants natifs (mm).

Diamètres de zones d'inhibition	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
C18	09	00	16	10	28
C20	00	00	21	10	27
C23	13	00	17	00	20
C24	09	00	16	11	30
F1	00	13	12	00	20
F2	07	07	12	15	22

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'activité antibactérienne des surnageants natifs des souches pures n'était pas semblable envers la collection des souches cibles. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions étaient compris entre 9 et 30mm. L'activité inhibitrice vis-à-vis de *Klebsiella* sp. était totalement absente.

Il apparaît que les surnageants du ferment mixte F1 n'arrivent pas à inhiber la croissance d'*E. coli* et *B. subtilis*, alors qu'ils présentent une bonne activité antimicrobienne contre les autres souches mises au test, d'où l'apparition de zones d'inhibition d'un diamètre compris entre 12 et 20mm. Les surnageants du ferment mixte F2 exercent une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis des cinq souches, avec des diamètres de zones d'inhibition qui oscillent entre 7 et 22 mm. La photo 11 montre l'activité inhibitrice des surnageants natifs des souches pures et ferments mixtes sur *L. monocytogenes*.



Photo 11 : Activité inhibitrice des surnageants natifs des souches pures et ferments mixtes sur *Listeria monocytogenes*.

La fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien, ce qui confirme la production d'agent antimicrobien par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Metlef et Bouras, 2009).

Les lactocoques sont capables de produire deux substances majeures (acide lactique et bactériocines) responsables de l'effet antagoniste. Les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent produire des quantités notables d'acides organiques autres que l'acide lactique et c'est le cas des leuconostocs qui produisent autant d'acétate que de lactate. L'acide acétique exerce une forte action inhibitrice à l'encontre de nombreux microorganismes (Bourgeois et Larpent, 1996).

III.5.6.2. Effets des surnageants neutralisés

Après élimination de l'effet des acides organiques, les surnageants neutres ont été testés pour leur activité inhibitrice contre les germes tests. Les résultats sont résumés dans le tableau 20.

Ces résultats montrent une perte de l'activité inhibitrice des surnageants vis-à-vis des souches pathogènes pour la totalité des souches pures sauf pour *E. coli* qui a été inhibée par les surnageants de *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 (18mm) et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 (12mm).

Tableau 20 : Activité inhibitrice des surnageants neutres (mm).

Diamètres de zones d'inhibition	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
C18	18	00	00	00	00
C20	12	00	00	00	00
C23	00	00	00	00	00
C24	00	00	00	00	00
F1	15	18	00	36	00
F2	14	00	00	34	00

L'association des souches lactiques (ferments F1 et F2) a permis l'inhibition de *E. coli* avec des diamètres des zones d'inhibition de 15 et 14mm pour les ferments F1 et F2 respectivement. Les deux ferments F1 et F2 ont révélé une activité inhibitrice très importante à l'égard de l'espèce *B. subtilis*, les diamètres des zones d'inhibition étaient de 36 mm pour F1 et 34 mm pour F2. Alors que, seul le ferment F1 a présenté un effet antagoniste à l'égard de *Klebsiella* sp. (18mm).

Tout cela nous laisse supposer que l'inhibiteur majeur est les acides organiques produits par nos souches lactiques. L'apparition de l'activité antagonistique, après élimination de l'effet de l'acide lactique, confirme l'existence des autres substances antibactériennes telles que le peroxyde d'hydrogène, diacétyl et les bactériocines.

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. Lorsqu'il est libéré à des concentrations suffisantes, il peut provoquer l'auto-inhibition ou inhiber d'autres contaminants de leur environnement (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Par ailleurs, les lactocoques produisent des bactériocines à spectre varié d'inhibition où deux ont été particulièrement caractérisées : la nisine produite par *Lc. lactis* ssp. *lactis* a un spectre d'inhibition large touchant la plupart des lactocoques et d'autres germes à gram positif, et la diplococcine produite par *Lc. lactis* ssp. *cremoris* (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Campos et al., 2006**).

Trias et al. (2008) ont observé un effet antimicrobien exercé par des souches de *Leuconostoc mesenteroides* vis-à-vis *Listeria monocytogenes*. Les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines ont été détectés en tant que principaux mécanismes d'inhibition.

III.5.7. Résistance aux antibiotiques

Les résultats de la résistance et la sensibilité des ferments mixtes et des souches pures aux antibiotiques sont groupés dans le tableau 21. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15mm sont considérées comme résistantes.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches pures montrent une résistance à trois sur cinq antibiotiques testés (Ampicilline, Kanamycine et Rifampicine), sauf la souche *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 qui présente une résistance pour deux antibiotiques seulement, elle est sensible à l'Ampicilline. Les deux ferments F1 et F2 sont sensibles aux trois antibiotiques : l'Ampicilline, la Spiramycine et la Vanomycine, mais résistants à la Kanamycine et Rifampicine.

Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Tableau 21 : Résultats de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

A10: Ampicilline ; **K30**: Kanamycine ; **Sp100**: Spiramycine ; **R5**: Rifampicine ; **VA30** : Vanomycine.

(**R**): résistant ; (**S**): Sensible

Ferment	A10	K30	Sp100	R5	VA30
C18	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
C20	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)
C23	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)
C24	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)
F1	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
F2	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). La résistance de souches de *Leuconostoc* sp. à la Vanomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol a été bien élucidée (**Ogier et al., 2008**). De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et la Vanomycine (**Donohue, 2004**).

Il est nécessaire avant de lancer une culture d'amorçage ou un produit probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques (**Ammor et Mayo, 2007**). Mais, selon **Donohue (2004)**, le criblage de telles souches pour la reconstitution de ferments lactiques n'est pas encore entrepris actuellement, à cause de la difficulté de l'évaluation *in vivo* du potentiel de transfert de gènes de résistance.

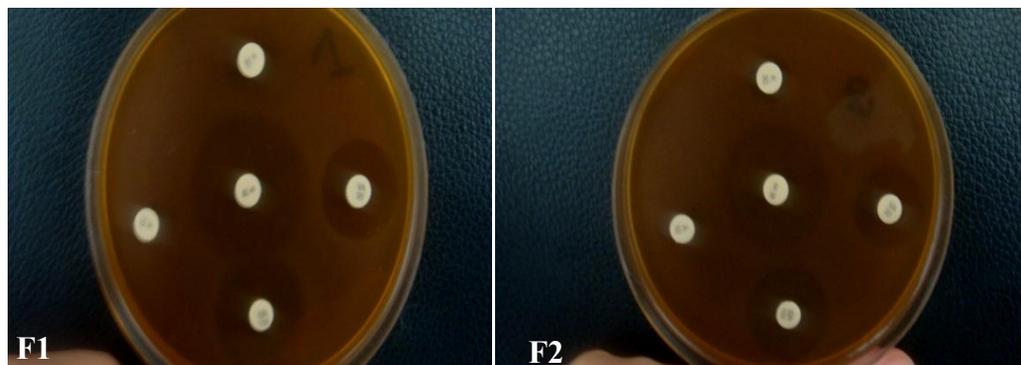


Photo 12 : AntibioGramme des deux ferments F1 et F2.

La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (**Marteau et al., 2004**). De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (**Zago et al., 2011**).

III.6. Fabrication du fromage frais et évaluation de sa qualité

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

III.6.1. Le produit fini et le rendement fromager

Dans cette partie, trois échantillons de fromages frais ont été fabriqués, deux à base de ferments mixtes sélectionnés, le troisième est à base d'un ferment industriel. Le coagulum est obtenu par une coagulation mixte : la coagulation dite lactique et celle engendrée par l'action de la présure. Ces deux modes ont une action simultanée sur le lait. L'égouttage a été spontané et a permis l'élimination de la plus grande partie du lactosérum qui imprègne le coagulum.

Nous avons obtenu des échantillons de fromage en forme de cylindre plat, d'un diamètre de 8 cm, une épaisseur d'environ 2cm et d'un poids net de $90\pm 5g$ (photo 13). Nous avons lui attribué un label « *Le petit frais* », comme nous avons lui choisi un emballage qui comporte les composants du produit y compris un code à barre.



Photo 13 : Aspect du fromage frais fabriqué.

Le tableau 22, présente le rendement fromager obtenu, le taux d'humidité finale du coagulum ainsi que le pourcentage en matière sèche.

Tableau 22 : Le rendement fromager.

FF1 : fromage à base de ferment F1; FF2 : fromage à base de ferment F2 ; FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Fromage	Rendement (%)	Humidité (%)	Matière sèche (%)
FF1	21.52	69.18	31.81
FF2	25.22	68.29	31.70
FFI	22.72	69.95	30.04

Selon la littérature, le rendement en fromage à pâte fraîche est généralement supérieur à 20%. Ce type de fromage est caractérisé par une humidité supérieure à 60% et un extrait sec de 13 à 20% (Alais et Linden, 1997). Ceci coïncide avec nos résultats, où le meilleur rendement obtenu était de 25.22% avec le fromage à base du ferment F2. Les fromages fabriqués à partir des ferments F1 et FI ont donné des rendements de 21.52% et 22.72% respectivement.

Le fromage fabriqué à partir du ferment industriel FI a montré le taux le plus élevé en humidité (69.95%). La teneur en matière sèche, qui est plus de 30%, est jugée comme élevée pour les trois échantillons de fromages. Cela peut être dû à la standardisation du lait en matière sèche.

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

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

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

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

III.6.2. Contrôle des fromages frais préparés

Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation (Poznanski *et al.*, 2004).

III.6.2.1 Qualité physico-chimique du fromage frais au cours de la conservation

III.6.2.1.1. Le pH et l'acidité

L'évolution du pH et de l'acidité des trois fromages fabriqués au cours du stockage est représentée par les figures 15 et 16.

D'après ces résultats, une diminution modérée du pH pendant toute la période de conservation est notée pour les trois fromages. A T_{J0} les valeurs de pH ont été situées entre pH4.85 et pH4.90. Après 15 jours (T_{J15}), le pH atteint les valeurs de pH4.67, pH4.76 et pH4.83 pour les fromages fabriqués à partir des ferments F2, F1 et FI respectivement. La diminution la plus marquée est celle du fromage FF2 (pH4.67).

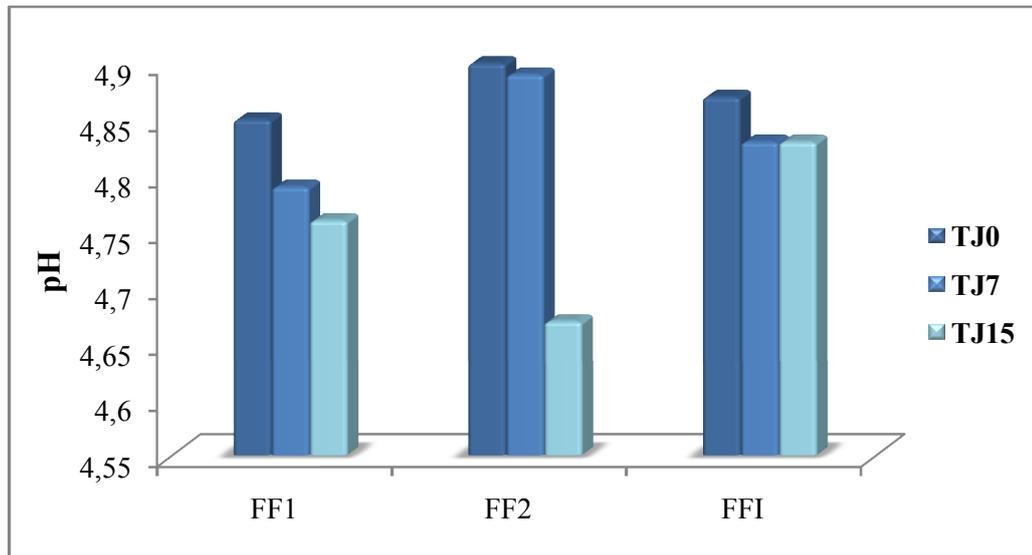


Figure 15 : Evolution du pH des trois fromages frais fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ;

FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Quant à l'acidité, nous avons remarqué une augmentation progressive pendant toute la période du contrôle. A T_{J0} les valeurs étaient comprises entre 7.5 et 10 g/l pour les trois fromages. Après 15 jours (T_{J15}), ces valeurs ont augmenté pour atteindre le maximum de 33.7g/l pour le fromage FF2.

L'augmentation de l'acidité couplée à la diminution du pH peut s'expliquer par l'existence d'une activité métabolique de la flore microbienne des fromages : l'ensemble des bactéries lactiques des ferments et du lait, ainsi que les levures et moisissures qui tolèrent les faibles pH ($\text{pH} < 5$) et les milieux acides.

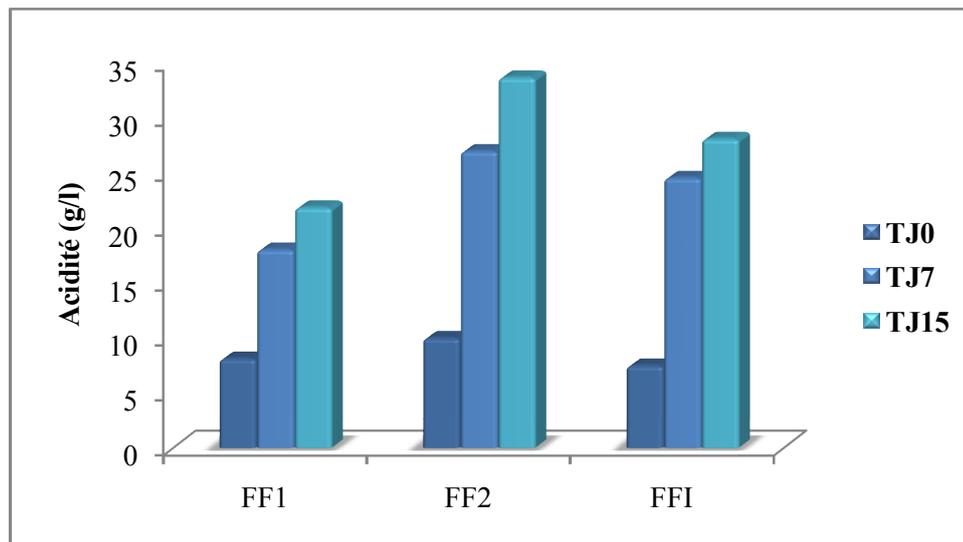


Figure 16 : Evolution de l'acidité des trois fromages frais fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ;
FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Il s'avère important de noter que le pH est lié à la qualité du fromage : un pH de 5.0 correspond à un fromage de bonne qualité, alors qu'un pH supérieur à 5.2 correspond à un fromage qui se détériore plus rapidement qu'un pH plus bas (Alais, 1984).

III.6.2.1.2. La matière sèche, organique et minérale

Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 17, 18 et 19. Il apparaît que les matières sèche, organique et minérale des trois fromages présentent une diminution progressive pendant la période du stockage.

A T_{J0} , les valeurs de la matière sèche étaient élevées, 30.04% pour le fromage à base du ferment industriel FI, 31.81% pour le fromage préparé à partir du ferment F1 et 31.70% pour le fromage à base du ferment F2, ensuite ces valeurs chutent au bout de 15 jours jusqu'à 24.94%, 26.01% et 28.26% pour les trois fromages FF1, FF2 et FFI respectivement. La perte la plus élevée est celle du fromage FF1 (21.59%) et la moins élevée est celle du fromage FFI (5.92%).

Cependant, les résultats du taux de la matière organique des deux fromages FF1 et FF2 semblent être quasi-similaire. Le fromage FFI montre les pertes les moins élevées (4.26%) par rapport aux fromages FF1 (20.78%) et FF2 (15.25%).

La matière minérale, quant à elle, a connu aussi des diminutions remarquables. Les pertes étaient de l'ordre de 27.83%, 34.57% et 50% pour les fromages FFI, FF1 et FF2 respectivement après 15 jours de stockage.

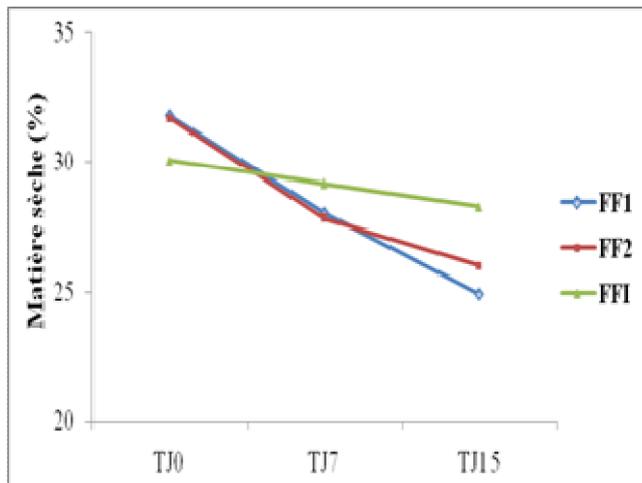


Figure 17 : Evolution de la matière sèche.

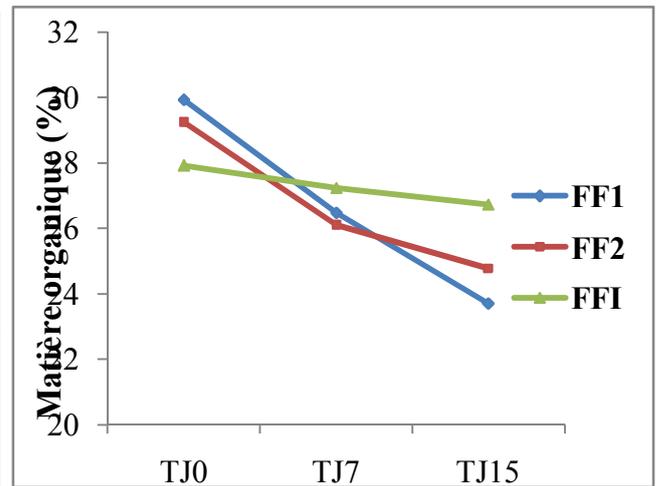


Figure 18 : Evolution de la matière organique.

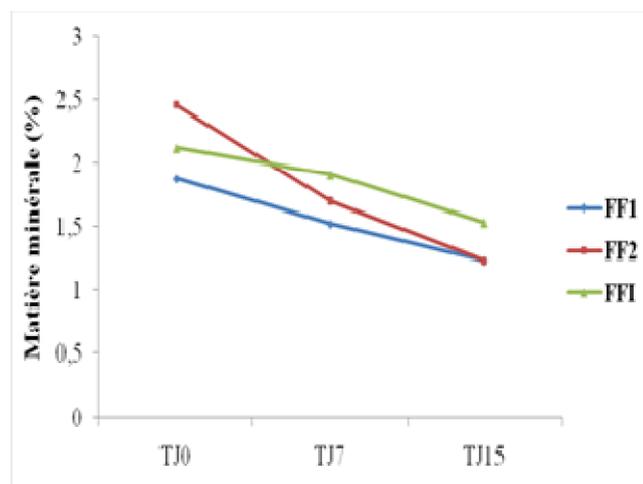


Figure 19 : Evolution de la matière minérale.

FF1 : fromage à base de fermet F1 ; FF2 : fromage à base de fermet F2 ;
FFI : fromage à base de fermet industriel FI.

III.6.2.1.3. Evolution de la fraction azotée

Les résultats des taux des protéines et l'azote total sont groupés dans le tableau 23. Il apparaît que le taux de protéines n'évolue pas considérablement au cours de la conservation. Les teneurs en protéines des deux fromages FF1 et FF2 sont moins élevées que celle du fromage FFI à tous les stades de contrôle. Les pertes sont estimées de 2.43%, 2.79% et 3.44% pour les fromages FFI, FF2 et FF1 respectivement.

Les valeurs de l'azote total des trois fromages varient de 2.87% à 3.99% à T_{J0}, elles sont inférieures à celles rapportées par Serhan *et al.* (2008) qui ont trouvé des valeurs allant de 5.05% jusqu'à 7.67%. Les quantités en azote total diminuent peu avec le temps où après 15 jours, la valeur minimale a été enregistrée avec le fromage FF1 (2.77%).

Tableau 23 : Evolution de la fraction azotée des fromages fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1; FF2 : fromage à base de ferment F2 ; FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Fromage	T _{J0}		T _{J7}		T _{J15}	
	Azote (%)	Protéines (%)	Azote (%)	Protéines (%)	Azote (%)	Protéines (%)
FF1	2.87	18.31	2.80	17.86	2.77	17.68
FF2	3.02	19.29	2.98	19.20	2.94	18.75
FFI	3.99	25.45	3.92	25.00	3.89	24.83

Ces diminutions en protéines et en azote total peuvent être liées à l'activité protéolytique exercée par les enzymes de la microflore des fromages (la flore originelle du lait et des ferments lactiques) et de l'agent coagulant, la présure.

Le développement microbien intensif succède généralement une phase pendant laquelle les bactéries lactiques sont lysées et libèrent dans le milieu leurs enzymes intracellulaires dans des conditions favorables de pH et de température, celles-ci sont alors susceptibles d'intervenir dans le processus de dégradation des constituants du caillé, notamment de la caséine (**Tourneur, 1972 ; Donkor et al., 2007**).

La protéolyse joue un rôle critique en déterminant les caractéristiques sensorielles typiques et représente un indicateur significatif de qualité. La protéolyse dans les fromages est provoquée par des enzymes du lait (plasmine) et la présure ajoutée, ou libérées par des micro-organismes. Les activités de ces enzymes réduisent la concentration en caséine et mènent à la formation de peptides de différentes tailles. Ces peptides peuvent être encore hydrolysés par les enzymes protéolytiques de la flore microbienne du fromage, en acides aminés libres (**Ong et al., 2007**).

III.6.2.2. Qualité microbiologique des fromages fabriqués

Les indicateurs de la qualité et des bonnes pratiques de fabrication des aliments pour **Cardinal (2003)**, sont les microorganismes et/ou leurs produits métaboliques, dont la présence dans des aliments peut être utilisée pour évaluer la qualité (fraîcheur) d'un produit. La teneur élevée en humidité rend les fromages frais un milieu favorable pour le développement de différent type de microorganismes.

III.6.2.2.1. Les levures et moisissures

La figure 20 montre l'évolution du nombre des levures et moisissures dans les trois fromages pendant leur conservation.

Les résultats présentent des différences du nombre de ces microorganismes entre les fromages élaborés. Le fromage FFI s'est trouvé le moins chargé que les deux autres fromages où dans ces derniers, nous n'avons pas noté vraiment des diminutions significatives durant la période de conservation.

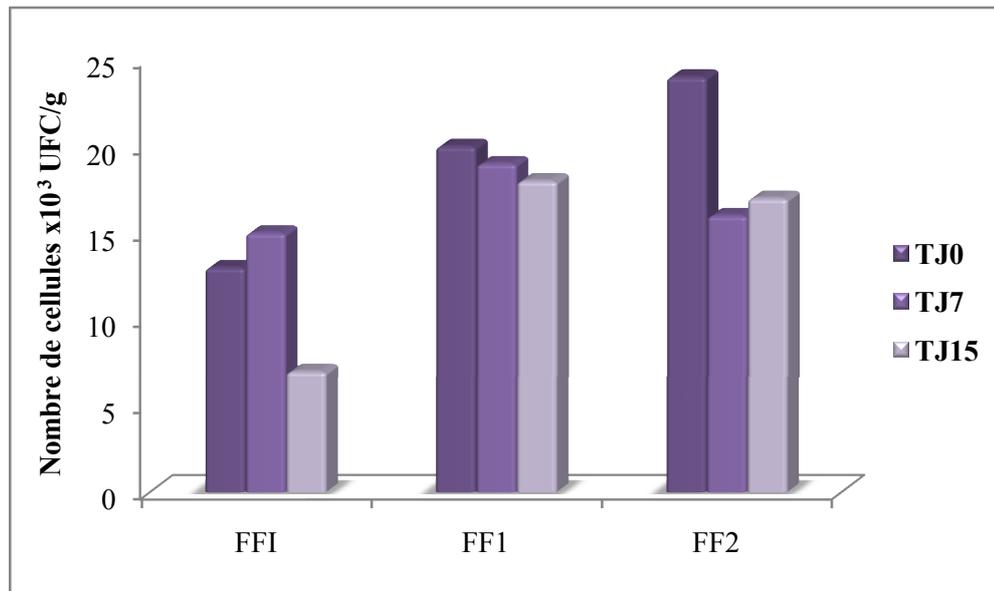


Figure 20 : Evolution de la charge en levures et moisissures dans les fromages fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ;

FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Les levures se trouvent aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des fromages. Elles sont en générales hâtives, car elles supportent bien les milieux acides (pH inférieur à 5) et salés. Les moisissures se trouvent le plus souvent en surface (Alais et Linden, 1997).

Benkerroum et Tamime (2004), ont rapporté que les dénombrements des levures et moisissures des fromages frais marocains peuvent dépasser 10^6 UFC/g.

Cependant et malgré l'importance des levures, Bouix et Leveau (1980), affirment que leur présence n'est pas souhaitée dans les produits alimentaires. Les levures n'étant pas pathogènes (à l'exception de *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*), elles ne causeront pas d'exception alimentaires, mais peuvent produire, par leurs développement dans les produits finis des altérations marchande par formation de trouble, d'odeurs ou de goût annexes anormaux et par la formation du CO_2 .

De même Moreau (1980), rapporte que la plupart des denrées alimentaires, au cours de leur préparation mais surtout de leur entreposage, sont susceptible d'être détériorées par les moisissures. Les pertes qui leurs incombent sont considérables, parfois l'altération aboutit à une modification de la valeur nutritionnelle, à l'apparition de saveurs indésirables, à d'autres cas, c'est la santé du consommateur qui est en jeu.

III.6.2.2.2. Les coliformes

Les résultats du dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants sont illustrés par les figures 21 et 22. Les chiffres obtenus témoignent une réduction du nombre de ces germes pendant le stockage.

La présence des coliformes totaux et thermotolérants dans les trois échantillons montre que la source de contamination peut se situer dans les opérations aboutissant à l'obtention du fromage au

sein du laboratoire. Le fromage à base du ferment industriel présente la plus faible contamination en coliformes comparativement aux deux fromages à base de ferments mixtes sélectionnés.

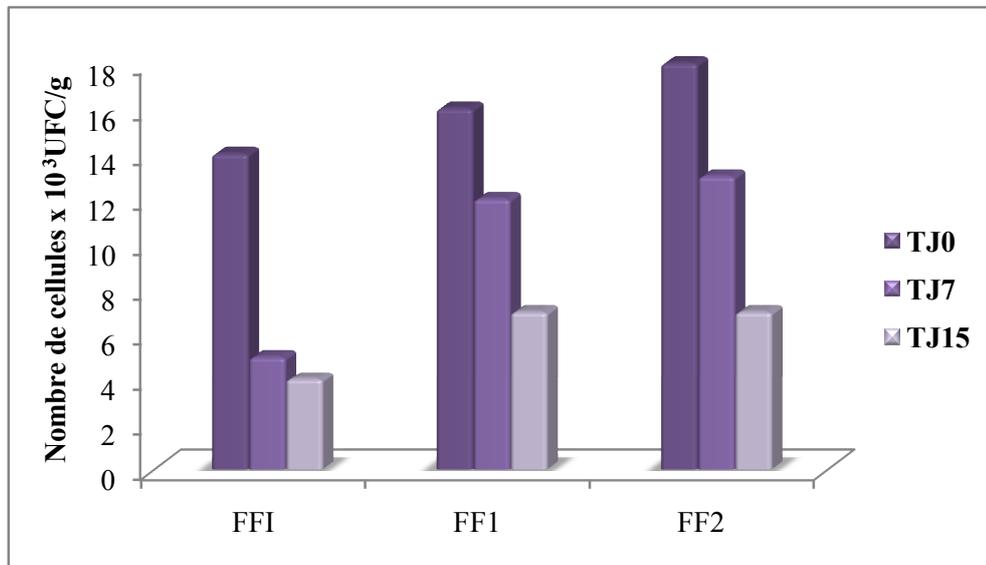


Figure 21 : Evolution de la charge en coliformes totaux des fromages fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ;

FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

La présence des coliformes totaux est maximale dans le fromage FF2 avec un nombre de 18×10^3 UFC/g à T_{J0} . Cette valeur devient 7×10^3 UFC/g après 15 jours. La même observation est enregistrée pour le fromage FF1.

Quant aux coliformes fécaux, les résultats ont montré leur présence à des taux de 12 à 16×10^2 UFC/g au jour de fabrication, ces valeurs diminuent jusqu'à 2×10^2 UFC/g après 15 jours.

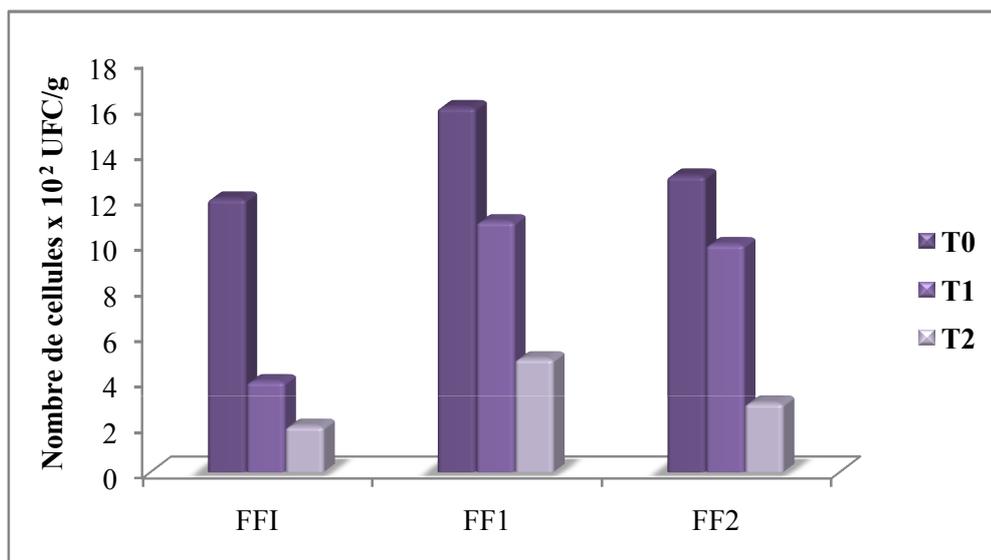


Figure 22 : Evolution de la charge en coliformes fécaux des fromages fabriqués.

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ;

FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

Les coliformes ont été également signalés à des nombres dépassant 10^5 UFC/g dans les fromages traditionnels marocains (**Benkerroum et Tamime 2004**). Par comparaison avec nos résultats, ces valeurs sont plus élevées que les notre.

La diminution en charge de ces germes, peut être expliquée par des changements dans le milieu, notamment la diminution du pH et la présence de certains inhibiteurs résultants de différents métabolites de la population microbienne existante.

III.6.2.2.3. La flore indologène, les staphylocoques et les salmonelles

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire. Il apparaît que les produits fermentés puissent être considérés comme « à faible risque » vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer (**Ho et al., 2007**).

Une absence totale de la flore indologène, des staphylocoques et des salmonelles a été enregistrée durant toute la période du contrôle des trois fromages. Cela indique l'état de propreté de l'ambiance environnante lors de la fabrication, et implique les bonnes pratiques de fabrication.

Nous pouvons dire alors que les trois fromages fabriqués sont de bonne qualité. Ces résultats sont contradictoires à ceux trouvés avec les coliformes, ce qui implique d'autres facteurs de contamination que nous n'arrivons pas à contrôler y compris la qualité microbiologique des additifs utilisés.

Généralement, dans les fromages, un nombre de dix cellules de staphylocoque est toléré, alors que l'absence des salmonelles est exigée (**Joffin et Joffin, 1999**).

Une étude réalisée par **Hamama (1989)**, a montrée la détection des salmonelles dans le fromage frais marocain fabriqué à la ferme, cette détection était expliquée par les conditions souvent hygiéniques dans lesquelles la préparation du fromage est réalisée.

III.6.2.3. Qualité sensorielle

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

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

Les résultats des tests de dégustation des fromages pendant la période de conservation sont résumés dans les tableaux 24, 25 et 26. La photo 14 montre l'aspect visuel des trois fromages frais élaborés.



Photo 14 : Aspect visuel des fromages frais fabriqués.

La qualité organoleptique de ces trois fromages frais, testée par le jury de dégustation sur un ensemble de caractères, est cotée bonne. Les résultats n'indiquent aucune différence significative ($P > 0.05$) entre l'ensemble des fromages fabriqués. A T_{J0} des notes de 7.85 ± 0.58 , 7.5 ± 0.44 et 6.9 ± 0.91 sont données aux fromages FFI, FF1 et FF2 respectivement. Ces dernières s'améliorent à T_{J7} pour atteindre la valeur de 8.3 ± 0.94 pour FFI, alors qu'à T_{J15} , elles diminuent pour les trois fromages pour avoir la valeur minimale de 6.2 ± 0.97 pour FF1.

Ces fromages se comportent bien lors du stockage. L'aspect extérieur a resté acceptable durant toute la période de conservation à 4°C . De même, la texture n'a pas vraiment changé, elle est notée comme « sableuse » dans la majorité des cas. L'arôme et l'odeur ont pris les caractéristiques des additifs ajoutés et surtout « l'ail », et le « petit lait ». Les dégustateurs ont attribué une saveur « acide et salée » pour les trois fromages frais avec, parfois des défauts d'amertume.

Tableau 24 : Résultats du test de dégustation à T_{J0} .

Caractère	T_{J0}		
	FFI	FF1	FF2
Surface	Non homogène	Lisse, peu homogène	Lisse
Texture	Cassante	Sableuse, friable	Sableuse, cassante
Odeur	Petit lait	Petit lait, ail	Beurre, ail
Arôme	Ail	Petit lait, ail	Ail, herbe
Saveur	Acide, salée	Acide, salée	Acide, salée
Sensations	Piquant, peu acide	Douceur, par fois piquant	Acide, piquant
Note sur 10	7.85 ± 0.58	7.5 ± 0.44	6.9 ± 0.91

Tableau 25 : Résultats du test de dégustation à T_{J7}.

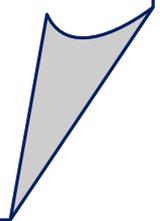
Caractère	T _{J7}		
	FFI	FF1	FF2
Surface	Lisse, peu homogène	Lisse	Lisse
Texture	Sableuse, friable	Sableuse, friable	Sableuse, friable
Odeur	Petit lait, ail	Petit lait, ail	Petit lait
Arôme	Lait frais, ail, herbe	Petit lait, ail	Petit lait
Saveur	Acide, salée	Acide, salée, amère	Acide, salé
Sensations	Douceur	Douceur	Piquant
Note sur 10	8.3±0.94	7.2±0.50	7.6±0.58

Tableau 26 : Résultats du test de dégustation à T_{J15}.

Caractère	T _{J15}		
	FFI	FF1	FF2
Surface	Peu lisse	Peu lisse	Homogène
Texture	Sableuse	Sableuse	Sableuse
Odeur	Petit lait, ail	Petit lait, ail	Petit lait
Arôme	Ail, beurre	Ail	Ail, herbe
Saveur	Acide	Acide, amère	Très acide
Sensations	Piquant	Piquant	Piquant
Note sur 10	6.4±1.49	6.2±0.97	6.7±1.32

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

Conclusion



Conclusion et perspectives

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continu.

Le but de cette étude était de mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant des applications alimentaires. A l'issue de ce qui a été réalisé, vingt-huit (28) souches ont été isolées, purifiées et identifiées à partir du beurre de chèvre originaire de la Wilaya de Jijel (Est d'Algérie).

L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La totalité était des coques appartenant aux trois genres *Lactococcus* (53.74%), *Streptococcus* (32.14%) et *Leuconostoc* (14.28%) où *St. salivarius* ssp. *thermophilus* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* sont les deux sous-espèces dominantes avec des pourcentages de 32.14% et 28.57% respectivement. Les sous-espèces *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* occupent la même proportion de 10.71%, suivie des espèces de *Lc. raffinolactis* et *Ln. lactis* avec un faible pourcentage de 3.57% pour chacune.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante que l'activité protéolytique et texturante. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

Les résultats acquis après l'étude des interactions entre des souches sélectionnées, ont permis de reconstituer deux ferments mixtes, chacun est composé de deux souches (F1 constitué de *Lc. lactis* ssp. *lactis* C18 et *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* C23 et F2 constitué de *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* C20 et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* C24). Ces ferments ont montré un bon pouvoir coagulant, épaississant et une capacité à produire des composés aromatiques.

L'activité protéolytique des ferments constitués est d'un intérêt capital pour l'industrie fromagère, de ce fait, une étude de cette dernière a été réalisée afin de caractériser les enzymes protéolytiques impliquées. Les résultats obtenus ont révélé une activité protéasique considérable. De plus, l'activité spécifique des exoprotéases était plus importante que celles des endoprotéases. Ces enzymes se sont avérées sensibles aux variations de la température d'où des pertes d'activité ont été enregistrées.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* des aptitudes probiotiques des ferments mixtes et des souches pures qui les composent, sont particulièrement intéressants. Les souches lactiques ont montré une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles : acidité, sels biliaires et sécrétions duodénales. Nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne, comme elles ont montré une bonne hydrophobicité et une capacité de s'adhérer au tissu épithéliale. Cependant une résistance modérée aux antibiotiques a été enregistrée.

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

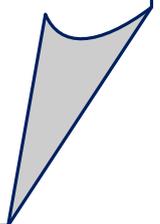
Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Donc pour compléter ce travail sur la flore lactique du beurre de chèvre, nous proposons :

Sur le plan technique, l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et signification de la microflore présente.

Sur le plan technologique, les souches de bactéries lactiques isolées peuvent faire l'objet :

- D'une mesure de leur résistance aux bactériophages, car cette caractéristique est directement reliée à la réussite ou non de la production fromagère.
- D'une étude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation.
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes, car la qualité des produits fermentés passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.
- D'une étude *in vivo* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes *in vitro* (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

Références Bibliographiques



A-B

- Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., 2005.** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* **3** : 59-63.
- Alais C. et Linden G., 1997.** Biochimie alimentaire. 4^e Ed., Masson. Paris. 185-187.
- Alais C., 1984.** Science du lait : principes des techniques laitières. 4^e Ed., SEPAIP. Paris. 814.
- Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., 2000.** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* **66**(5) : 2001-2005.
- Amariglio S., 1986.** Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physiques et chimiques. Méthode II-3. *AFNOR- ITSV.* 123-124.
- Ammor M.S. et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* **76** : 138-146.
- Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* **17** : 454-461.
- AOAC, 1997.** Official Methods of Analysis. 15^e Ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C.
- Aslam S. et Qazi J.I., 2010.** Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* **42**(5) : 567-573.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 271-447.
- Awad S., Ahmed N. et El Soda M., 2007.** Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chem.* **104** : 1192-1199.
- Axelsson L., 2004.** Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Technol.* **23**: 30-37.
- Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R., 1983.** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *App. Env. Microbiol.* **45** : 1808-1815.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 661-765.
- Beerens H. et Luquet M.F., 1987.** Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 1-144.
- Benkerroum N. et Tamime A.Y., 2004.** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* **21** : 399-314.
- Botes M., van Reenen C.A. et Dicks L.M.T., 2008.** Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **128** : 362-370.
- Bouix D. et Leveau J.Y., 1980.** Les levures : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, le contrôle microbiologique. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali.* **2** : 159-161.
- Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 432-704.
- Bouzar F., Cerning J. et Desmazeaud M., 1997.** Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production. *J. Dairy Sci.* **80** : 2310-2317.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye bindings. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007.** Microbiochimie et alimentation. *Educagri Edition*. 166-168.
- Broadbent J.R., 2001.** Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2^e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 243-300.
- Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilan C.G. et Reinheimer J., 2008.** Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* **18** : 377-385.

C-D

- Cailliez-Grimal C., Edima H.C., Rvol-Junelles A.M. et Millière J.B., 2007.** *Carnobacterium maltaromaticum* : the only *Carnobacterium* species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. *J. Dairy Sci.* **90** : 1133-1138.
- Campos C.A., Rodriguez O., Calo-Mata P., Prado M. et Barros-Velazquez J. 2006.** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* **39** : 356-364.
- Cardinal P., 2003.** Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire, comité provincial sur l'uniformisation et l'interprétation des critères microbiologiques des aliments. *Edition Québec.* 44-46.
- Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V. et Reinheimer J., 2010.** Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. *In: Biotechnology of lactic acid bacteria : Novel Applications* (Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M.). 177-192.
- Cerning J., 1990.** Exocellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* **87**: 113-130.
- Chamba F.J., 2008.** Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. *In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 787-813.
- Charlier C., Cretenet M., Even S. et Le Loir Y., 2009.** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* **131** : 30-39.
- Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., 2006.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.* **9**(7) : 1242-1249.
- Choisy C., Desmazeaud M., Guéguen M., Lenoir J., Schmidt J. L. et Tourneur C., 1997.** Les phénomènes microbiens. *In : Le fromage* (Eck A. et Gillis J.C.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 377-446.
- Cholet O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. *Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.* 16.
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993.** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (**75**) : 595-603.
- Coulon J.B., Delacroix-Buchet A., Martin B. et Pirisi A., 2005.** Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. *INRA. Prod. Anim.* **18** : 49-62.

Crow V.L., Holland R., Pritchard G.G. et Coolbear T., 1994. The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **4** : 723-742.

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

Denohue D.C., 2004. Safety of novel probiotic bacteria. *In*: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 531-546.

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

Desmazeaud M.J. et Vassal L., 1979. Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles : Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait.* **587** : 327-344.

Doleyres Y., Paquin C., Leroy M. et Lacroix C., 2002. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *App. Microbiol. Biotechnol.* **60** : 168-173.

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

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

E-F

Eck A. et Gillis J.C., 1979. Le fromage. 3^e édition. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.

Edima H.C., 2007. *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 57-66.

El-Ghaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., El Mecherfi K.E., Bazukyane I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y.G., A. Kuliev A., Mozzi F., Chobert J.M. et Haertlé T., 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre. Food Sci. Technol.* 1-8.

Even S., Lindley N.D. et Cocaign-Bousquet M., 2003. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology.* **149** : 1935-1944.

FAO et OMS, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in Food

Fernandez de Palencia P., Pelaez C. et Martin-Hernandez M.C., 1997. Purification and characterization of the cell wall proteinase of *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL731 isolated from raw goat's milk cheese. *J. Agri. Food Chem.* **45** : 3401-3405.

Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Coolbear T., Holland R. et Kuipers O.P., 2000. Cloning, characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.* **66** : 1360-1368.

Fleming H.P., Etechells J.L. et Costilow R.N., 1975. Microbial inhibition of isolates of *Pediococcus* from cucumber brine. *App. Env. Microbiol.* **30** : 1040-1042.

Fox P.F. et McSweeney E.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.* **12**(4) : 457-509.

G-H

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

Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* **21** : 97-102.

Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* **29** : 591-610.

Giaouris E., Chapot-Chartier M.P. et Briandet R., 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* **131** : 2-9.

González L., Sacristán N., Arenas R., Fresno J.M. et Tornadijo M.E., 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.* **27** : 592-597.

Gu R.X., Yang Z.Q., Li Z.H., Chen S.L. et Luo Z.L., 2008. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe.* **14** : 313-317.

Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. et Le Mair T., 2008. Recommendation Pratique: Probiotiques et Prébiotiques. *WGO Practice Guidelines.* 3.

- Guessas B. et Kihal M., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* **3**(6) : 339-342.
- Guglielmotti D.M., Marco M.B., Golowezye M., Reinheimer J.A. et Quiberoni A.D.L., 2007.** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* **17** : 916-925.
- Guiraud J.P. et Galzy P., 1980.** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Les éditions de l'ausine nouvelle.* 1-239.
- Guiraud J.P. et Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237-251.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *1^e Ed., Dunod.* Paris. 136-144.
- Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.
- Guo Y., Pan D., Zeng X. et Tanokura M., 2009.** Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* **112** : 533-538.
- Gusils C., Chaia A.P., Olivier G. et Gonzalez S., 2010.** Microtechnique for identification of lactic acid bacteria. *Methods in molecular biology*, Vol. **268** : Public Health Microbiology: Methods and Protocols. *Humana Press.* Totowa. 453-458.
- Haddie J.M., 1986.** Other streptococci. *In* : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). **1** : 1070.
- Hamama A., 1989.** Qualité bactériologique des fromages frais marocains. *Options méditerranéennes, Seri- séminaire,6,* 223-227.
- Hassaïne O., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2007.** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr. J. Biotechnol.* **6** (14) : 1720-1727.
- Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. *In*: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2^e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.
- Hassan A.N., Awad S. et Muthukumarappan K., 2005.** Effects of exopolysaccharide-producing cultures on the viscoelastic properties of reduced-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **88** : 4221-4227.
- Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- Hogg T., 2005.** Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.
- Hydrominus B., Le Marrec P., Hadj Sassi A. et Deschamps A., 2000.** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **61** : 193-197.

I-J

Idoui T., 2008. Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179.

Idoui T. et Karam N.E., 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. **59**(4) : 361-367.

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

Iyer R., Tomar S.K., UmaMaheswari T., Singh R., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **20** : 133-141.

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G., 2006. Science des aliments : Technologie des produits alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*, Paris. **2** : 40-55.

Joffin C. et Joffin J.N., 1999. Microbiologie alimentaire. *Ed. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine*. 70-73.

Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud M.J. et Boquien C.Y., 1987. Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait*. **67** : 149-172.

K-L

Kacem M. et Karam N.E., 2006. Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Gr. Y. Aceites*. **57**(2) : 198-204.

Kailasapathy K., 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria : technology and potential applications. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* **3** : 39-48.

Karam N., 1995. Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : étude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 212.

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

Kimoto-Nira H., Kobayashi M., Nomura M., Sasaki K. et Suzuki C., 2009. Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *Int. J. Food Microbiol.* **131** : 183-188.

- Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C. et Divya., 2009.** Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis subsp. lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.* **4(3)** : 1-6.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **144** : 237-250.
- Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canada.* 23-47.
- Larpent J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier.* Paris. 10-72.
- Law J. et Haandrikman A., 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 1-11.
- Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994.** Les grands groupes de bactéries. *In* : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN.* Paris. 445.
- Lecoq R., 1965.** Manuel d'analyses alimentaires et expertises usuelles. *Doin.* Paris. 1304-1311.
- Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* **15** : 67-78.
- Leroy F. et De Vuyst L., 2007.** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13** : 194-199.
- Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I. et Talon R., 2007.** Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* **25(5)** : 172.
- Leveau J.Y. et Bouix M., 1993.** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 85-87.
- Leveau J.Y., Bouix M. et De Roissart H.B., 1991.** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. *2^e Ed., Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. **3** : 2-40.
- Lin T.Y. et Chien M.F.C., 2007.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food .Chem.* **100** : 1419-1423.
- Looijesteijn P.J., Trapel L., de Vries E., Abee T. et Hugenholtz J., 2001.** Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64** : 71-80.
- Luquet F.M. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 3-37.

Ly-Chatain M.H., Le M.L., Thanh M.L., Belin J.M. et Waché Y., 2010. Cell surface properties affect colonisation of raw milk by lactic acid bacteria at the microstructure level. *Food Res. Int.* **43** : 1594-1602.

M-N

Mahaut M., Jeantet R. et Brule G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 154-180.

Mangia N.P., Murgia M.A., Garau G., Sanna M.G. et Deiana P., 2008. Influence of selected lab culturs on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiol.* **25** : 366-377.

Marteau P. et Seksik P., 2004. Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.* 73-76.

Martley F.G., 1983. Temperature sensitivities of thermophilic starter strains. *New Zeal J. Dairy Sci. Technol.* **18** : 191-196.

Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K. et Holzapfel W.H., 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **126** : 57-64.

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

McDonald L.C., Fleming H.P. et Hassan H.M., 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *App. Env. Microbiol.* **56(7)** : 2120-2124.

Metlef S. et Dilmi-Bouras A., 2009. Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Rev. Nat. Tec.* **1** : 33-44.

Milesi M.M., Candiotti M. et Hynes E., 2007. Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT.* **40** : 1427-1433.

Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., 2008. Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* **88** : 695-705.

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

Moreau C., 1980. Les moisissures : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, le contrôle microbiologique. *Col. Sci. Tech. Agro. Ali.* **3** : 331-333.

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

Mozzi F., Torino M.I. et Valdez G.F., 2001. Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. **14**: *Food Microbiol. Protocols. Humana Press.* Totowa. 183-190.

Nancib A., Nancib N., Meziene-Cherif D., Boubendir A., Fick M. et Boudrant J., 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bior. Technol.* **96** : 63-67.

Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 547-560.

O-P

O'Sullivan E. et Condon S., 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.* **63**(11) : 4210-4215.

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

Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., et Onilude A.A., 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African.J. Biotechnol.* **2**(8) : 219-227.

Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K., 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.* **87**(1-2) : 153-159.

Ong L., Henrikssonb A. et Shaha N.P., 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *Int. Dairy J.* **17** : 67-78.

Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **49**(3-4) : 46-54.

Pan D. et Mei X., 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohy. Polymers.* **80** : 908-914.

Pan W.H., Li P.L. et Liu Z., 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Food Microbiol. Anaerobe.* **12** : 148-152.

Patterson C.A., 2008. Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. *AAFC.* 1-4.

- Percival M., 1997.** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* **6**(1): 95-100.
- Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F. et de Valdez G.F., 2010.** Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **141** : 73-81.
- Phalip V., Monneta C., Schmitt P., Renault P., Godonb J.J., et Divib C., 1994.** Purification and properties of the α -acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *FEBS Letters.* **351** : 95-99.
- Picon A., Garcia-Casado M.A. et Nunez M. 2010.** Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* **20**: 156-162.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2^e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 1998.** Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.
- Pot B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris.1-106.
- Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., 1996.** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** : 213-222.
- Poznanski E., Cavazza A., Cappa F. et Cocconcelli P.S., 2004.** Alpine environment microbiota influences the bacterial development in traditional raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **92** : 141-151.

R-S

- Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. et Vaughan, E.E., 2002.** Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Env. Microbiol.* **68** : 1882–1892.
- Raynaud S., Perrin R., Cocaïgn-Bousquet M. et Loubière P., 2003.** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* **71**(12) : 8016-8023.
- Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas-Madiedo P., 2011.** Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* **162** : 514-519.
- Robin J.M. et Rouchy A., 2001.** Les probiotiques. *CEDN. Nutrithérapie. Info.*1-4.

- Rodriguez J.M., Martínez M.I., Horn N. et Dodd H.M., 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80** : 101-116.
- Rokka S. et Rantamaki P., 2010.** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* **213** : 1-12.
- Roos S. et Jonsson H., 2002.** A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* **148** : 433-442.
- Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* **34** (2) : 218-227.
- Roukas T. et Kotzekidou P., 1998.** Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enz. Microbiol. Technol.* **22** : 199-204.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84** : 197-215.
- Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. et Benno Y., 2004.** Human studies on probiotics: what is scientifically proven today. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 515-530.
- Savijokie K., Ingmer H. et Varmanen P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** : 394-406.
- Savoy de Giori G. et Hébert M., 2001.** Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. **14**: *Food Microbiol. protocols.* *Humana Press.* Totowa. 197-202.
- Schillinger U., Guigas C. et Holzapfel W.H., 2005.** *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* **12** : 1289-1297.
- Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* **46** : 201-203.
- Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., 2009.** Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* **26** : 645-652.
- Serhan M., Linder M., Hosri C. et Fanni J., 2008.** Physic-chemical modifications and evolution of lipolysis and proteolysis during ripening of traditional Lebanese Darfiyeh cheese. *J. Dairy Res.* **88** : 1123-1130.
- Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **17** : 1262-1277.

Simon D., François M. et Dudez P., 2002. Transformation des produits laitiers frais à la ferme. *Educagri*. 73-90.

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

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

Streit F., Corrieu G. et Béal C., 2007. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* **128** : 659-667.

Sutar I.I., Vatak H.G., Srinivasan M.C. et Sivaraman H. 1986. Production of alkaline protease by immobilized mycellium of *Condiobolus*. *Enz. Microbiol. Technol.* **8** : 632-634.

T-V

Tadesse G., Ephraim E. et Ashenafi M., 2004. Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Int. J. Food Safety.* **5** : 13-20.

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

Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81** : 1-10.

Thapa N., Pal J. et Tamang J.P., 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* **107** : 33-38.

Thivierge N., 1999. Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pour le développement des ferments mésophiles à aptitudes fromagère élevées (Cheddar). *Mémoire M. Sc. National Library of Canada*.

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

Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996. Antimicrobial substance produced by *lactobacillus* sp. TGR-2 isoleted from Growol. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* **3(2)** : 29-34.

Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* **99** : 30-37.

Tourneur C., 1972. Aptitude à la protéolyse des lactobacillus présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie. *Le lait*. 513-514.

Trias R., Badosa E., Montesinosand E. et Bañeras L., 2008. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Int. Dairy J.* **18** : 1-5.

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

Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U. et Holzapfel W.H., 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* **109** : 205-214.

Vuillemard J.C., 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. **3** : 1-65.

W-Z

Walling E.G., Indreau E. et Lonvaud-Funel A., 2001. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. *INRA*. 289-300.

Wang C.Y., Lin P.R., Ng C.C., Shyu Y.T., 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. **16** : 578-585.

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

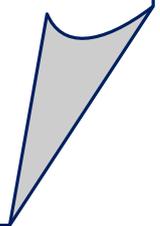
Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J. et Smit G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* **12** : 91-109.

Wu M.H., Pan T.M., Wu Y.J., Chang S.J., Chang M.S., et Hu C.Y., 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 1-7.

Zadi H., 1998. Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Constantine, Algérie. 205.

Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J. et Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* **28** : 1033-1040.

Annexes



Annexe I : Composition des milieux de culture, réactifs et tampons

▪ Milieu MRS (pH 6.5)

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

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

▪ Milieu Gibson-Abdelmalek (pH 6.5)

Extrait de levure	2.5g
Glucose	50g
Jus de tomate.....	100ml
Lait	800ml
Gélose nutritive ordinaire	200ml

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

▪ Bouillon hypersalé (pH 7.2)

Extrait de viande.....	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl.....	40/65g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ Gélose semi-solide au lait citraté

Lait écrémé à 10%.....	10.5ml
Citrate de sodium.....	0.5ml

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

▪ Lait tournesolé

Lait écrémé à 12%.....	1000ml
Teinture de tournesol à 4%	10ml

Stérilisation par autoclavage à 110°C pendant 5min.

- **Gélose hypersaccharosée (pH 6.8)**

Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	3g
Peptone	2.5g
Saccharose	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl.....	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

- **Gélose aux triglycérides (pH 6.5)**

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Triglycérides	10ml
Agar	15g

Stérilisation à 110°C pendant 5min.

- **Gélose Agar au lait** : Il se compose d'un mélange de deux milieux

Milieu A : pour un litre

Agar	3%
Extrait de levure	1%

Autoclaver à 121°C pendant 15min.

Milieu B : pour un litre

Lait écrémé.....	6%
Pourpre de Bromocrésol	0.006%

Stérilisation par tyndallisation 3 fois à 100°C

Mélange A/B : Agar 1.5%, extrait de levure 0.5%, lait écrémé 3.0%, pourpre de Bromocrésol 0.003%.

- **Réactif de Bradford**

Bleu de coomassie G250.....	10mg
Ethanol (95%)	50ml
Acide phosphorique (85%)	100ml
Eau distillée qsp	1000ml

- **Solution de Ringer (pH 7)**

NaCl.....	9g
KCl	0.42g
CaCl ₂	0.48g
NaHCO ₃	0.2g
Autoclavage à 120°C pendant 15min.	

- **Tampon PBS (pH 7.2)**

Na ₂ HPO ₄	10.9g
Na ₂ H ₂ PO ₄	3.2g
NaCl.....	90g
Eau distillée qsp	1000ml
Diluer 1/10 dans l'eau distillée avant l'utilisation.	

- **Tampon phosphate urée sulfate magnésium (pH 6.5)**

K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O.....	22.2g
KH ₂ PO ₄	7.26g
Urée	1.8g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.02g
Eau distillée qsp	1000ml

- **Sécrétion duodénale synthétique (pH 7)**

NaHCO ₃	6.4g
NaCl.....	1.28g
KCl	0.239g
Eau distillée qsp	1000ml

Annexe II : Coloration de Gram

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

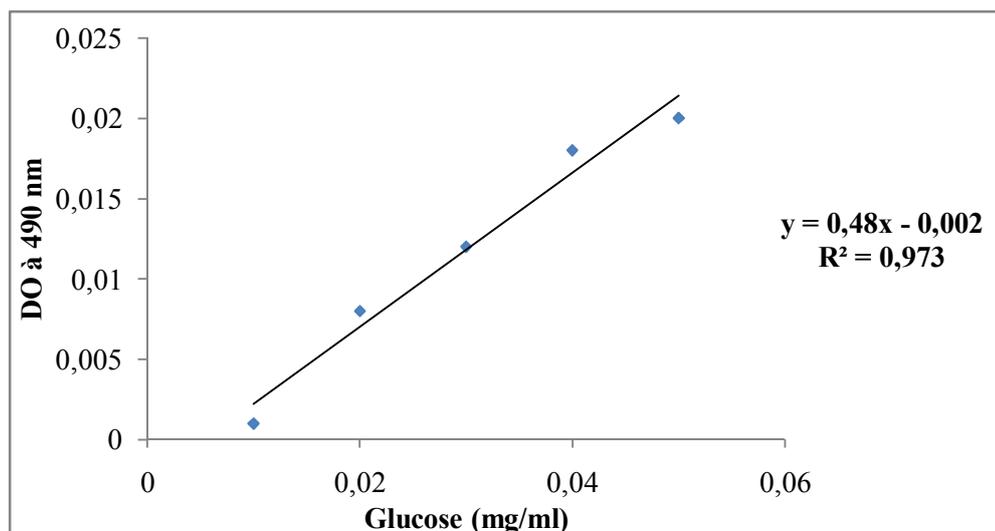
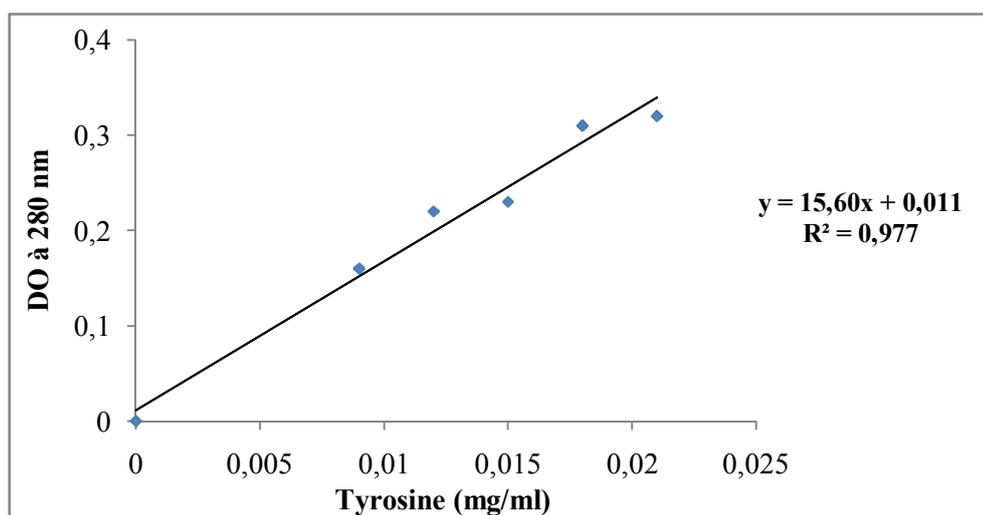
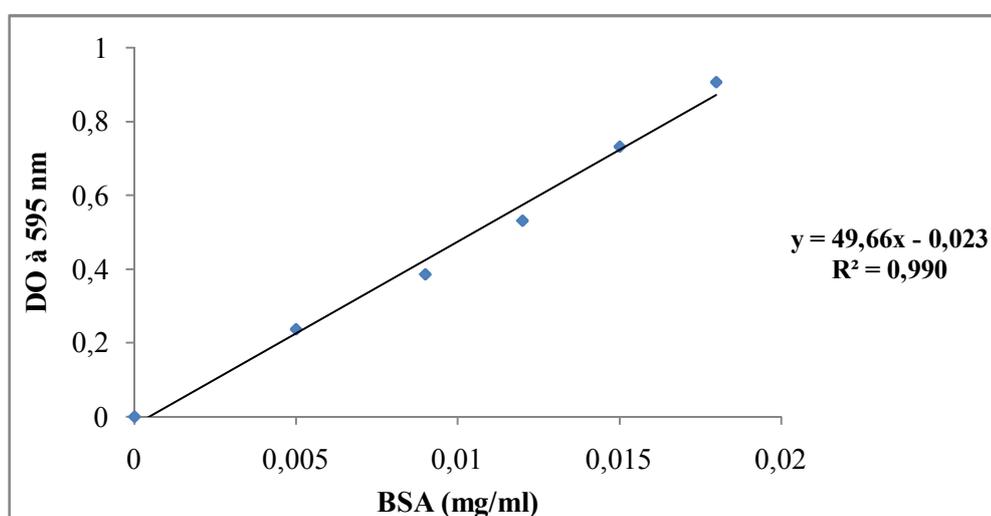
- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

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

Annexe III : Pouvoir acidifiant

Tableau III.1 : Evolution du pH au cours du temps.

Souches	T0h	T2h	T6h	T24h
C01	6.74	6.76	6.48	5.04
C02	6.74	6.60	6.46	4.80
C03	6.74	6.67	6.40	5.14
C04	6.74	6.64	6.38	5.19
C05	6.74	6.66	6.42	4.79
C06	6.74	6.21	5.44	4.97
C07	6.74	6.11	5.90	4.79
C08	6.74	6.25	5.89	4.83
C09	6.74	6.17	5.93	4.83
C10	6.74	6.15	5.87	4.90
C11	6.74	6.41	6.04	4.97
C12	6.74	6.62	6.34	4.95
C13	6.74	6.26	6.13	4.98
C14	6.74	6.21	6.47	5.19
C15	6.74	6.60	6.46	4.94
C16	6.74	6.62	6.30	5.22
C17	6.74	6.53	6.07	5.02
C18	6.74	6.64	6.20	4.97
C19	6.74	6.46	6.09	4.95
C20	6.74	6.48	6.21	4.87
C21	6.74	6.56	6.12	4.95
C22	6.74	6.51	6.14	4.95
C23	6.74	6.46	6.13	4.98
C24	6.74	6.50	6.13	4.96
C25	6.74	6.63	6.26	5.30
C26	6.74	6.53	6.18	5.16
C27	6.74	6.54	6.20	5.16
C28	6.74	6.53	6.17	5.17

Annexe IV : Courbes d'étalonnage**Figure IV.1 : Courbe d'étalonnage du glucose.****Figure IV.2 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.****Figure IV.3 : Courbe d'étalonnage de la BSA.**

Annexe V : Fabrication fromagère

Tableau V.1 : Calcule du rendement

FF1 : fromage à base de ferment F1 ; FF2 : fromage à base de ferment F2 ; FFI : fromage à base de ferment industriel FI.

	Volume du lait mis en œuvre (ml)	Poids du lait (g)	Volume du lactosérum exsudé (ml)	Poids de coagulum (g)	Rendement (%)
FF1	1500	1584	1230	341	21.52
FF2	1500	1586	1100	400	25.22
FFI	1500	1584	1175	360	22.72



Figure V.1 : Emballage des fromages frais fabriqués.

Annexe VI : Fiche de dégustation de fromage

Description de l'apparence extérieure : (croûte)			
Surface :	Irrégularité :	Forme :	Couleur :

Description de la pâte à la coupe : (texture)		
Couleur	Elasticité	Homogénéité
Blanc Blanc crème Ivoire Crème Jaune pâle Jaune paille bleu vert Ocre Orangé	Elastique souple Ferme Sableux Cassant Friable	Homogène Ouvertures Crevasse

a) Description de l'odeur : (par le nez sans mettre le produit en bouche) : colonne A														
b) Description de l'arôme : (encours de mastication) : colonne B														
Lactique			Végétal			Fruité /Florale			Torréfié/Animal			Epicé/Autres		
	A	B		A	B		A	B		A	B		A	B
Lait frais			Herbe			Noisette			Fumé			Poivre		
Beurre			Ortie			Fruits secs			Amandes			Vanille		
Petit lait			Foin			Agrumes			grillées			Muscade		
yogourt			Copeaux			Fleurs miel			Oignon grillé			Etable		
			Ail						Caramel mou					

Description de la saveur	Nom du fromage : Label : Origine : Lait : Croûte : Pâte : Note finale :
Sucrée Acide Salée Amère	
Descriptions des sensations	
Douceur Piquant Acre Brûlant	
Description finale en bouche	
Agréable Très typique Riche en arôme Intense en goût Persistante Plutôt courte	