

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche  
scientifique

Université de Jijel

Faculté des sciences.

Mémoire de fin d'étude  
En vue de l'obtention du diplôme d'études  
supérieures en biologie.

Option : Microbiologie.

Thème :

Isolement, Purification, Caractérisation et Identification  
des bactéries Lactiques  
(Souchier).

Réalisé par :

- ✦ Boutouatou Linda.
- ✦ Miloudi Hanane.
- ✦ Ben Aouida Ratiba.

membres de jury :

- ✦ President : Boudjerda Djamel
- examinatrice : Adoui Mounira.
- Promoteur : Idoui Tayeb.

2003/2004

# Remerciement

*Nous remercions dieu tout puissant qui nous a donné du courage et de la volonté d'avoir réussi dans notre vie éducationnelle et privée.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre reconnaissance, à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à sa réalisation.*

*Ce sujet passionnant est la proposition de Mr. Idoni Tayeb. C'est à lui que nous adressons en premier lieu notre reconnaissance ; pour nous avoir offert sa collaboration en nous confiant ce sujet. Qu'il trouve ici nos vifs remerciements et le témoignage de notre gratitude pour sa disponibilité permanente, pour son écoute, sa compréhension, sa confiance et les prestigieux aides qu'il nous a apportés.*

*Nos vifs remerciements vont aux Membres de Jury, pour avoir accepté de juger notre travail.*

*Ce travail, n'aurais jamais vu le jour, sans l'aide et la présence de nombreux hommes et femmes, qui travaillent dans l'ombre, pour assurer notre formation. Nous citons tous les services de l'université de Jijel, comme le laboratoire de biologie, en particulier Mlle Zenir Sonia, la bibliothèque etc.... Nous leur témoignons ici toute notre gratitude en leur présentant, nos sentiments les plus respectueux.*

*Ratiba, Linda, Hanane*

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<i>Analyse bibliographique :</i>	
<i>Chapitre I : les bactéries lactiques.</i>	
<i>I-1 Définition:</i> .....	2
<i>I-2 Propriétés générales:</i> .....	2
<i>I-3 Origine:</i> .....	3
<i>I-4 Classification:</i> .....	3
<b>I-4-1- Genre <i>Streptococcus</i>:</b> .....	4
<b>I-4-2- Genre <i>Lactococcus</i>:</b> .....	4
<b>I-4-3- Le genre <i>Leuconostoc</i>:</b> .....	5
<b>I-4-4- Le genre <i>Pediococcus</i>:</b> .....	7
<b>I-4-5- Le genre <i>Lactobacillus</i>:</b> .....	9
<b>-Groupe I:</b> .....	9
<b>- Groupe II:</b> .....	9
<b>- Groupe III:</b> .....	10
 <b>Chapitre II: rôles et intérêts des bactéries lactiques en industries alimentaires.</b>	
<b>II-1 introduction:</b> .....	12
<b>II-2 produits laitiers:</b> .....	12
<b>II-2-1 laits fermentés:</b> .....	13
• <b>Le yaourt:</b> .....	13
<b>II-2-2 Le kéfir et Koumiss :</b> .....	13
<b>II-2-3 Beurre et crème :</b> .....	13
<b>II-2-4 Fromage :</b> .....	14
<b>II-3 Panification :</b> .....	14
<b>II-4 produits carnés :</b> .....	14
<b>II-5- produits végétaux :</b> .....	14

### *Chapitre III : aptitudes technologiques des bactéries lactiques.*

<b>III.1. Acidification :</b> .....	16
III.2. Rôle de la protéolyse: .....	16
III.3. Production de polysaccharides : .....	16
<b>III.3.1. Cas des bactéries thermophiles :</b> .....	16
<b>III.3.2. Cas des bactéries mésophiles :</b> .....	17
III.4. Production d'arôme : .....	17
III.5. Rôle dans la production de facteurs antimicrobiens : .....	17
<b>III.5.1. L'acide lactique et le pH :</b> .....	17
<b>III.5.2. Composé divers :</b> .....	18
<b>III.5.3. Les bactériocines et la nisine :</b> .....	18

### **Chapitre IV : Les levains lactiques.**

<b>IV.1. Introduction :</b> .....	19
IV.2. Définition et rôle des levains lactiques : .....	19
IV.3. Principaux levains et leurs compositions : .....	19
<b>IV.3.1. Levains de culture pure :</b> .....	19
<b>IV.3.2. Levains mixtes :</b> .....	19
<b>IV.3.3. Levains naturels :</b> .....	20
IV.4. Différentes formes de levains : .....	20
<b>IV.4.1. Cultures liquides :</b> .....	20
<b>IV.4.2. Cultures lyophilisées :</b> .....	20
<b>IV.4.3. Cultures concentrées :</b> .....	20
<b>IV.4.4. Cultures concentrées congelées :</b> .....	20
<b>IV.4.1. Cultures concentrées lyophilisées :</b> .....	21
IV.5. Préparation : .....	21
IV.6. Choix du levain : .....	21

## Etude expérimentale:

### Matériel et méthode

<b>I. Matériel et Méthodes :</b> .....	22
<b>I.1. Matériel :</b> .....	22
I.1.1. Matériel biologiques :.....	22
I.1.2. Milieux de cultures :.....	22
I.1.3. Les sucres :.....	23
I.1.4. Autres produits :.....	23
<b>I.2. Méthodes :</b> .....	24
I.2.1. Techniques d'isolement, purification, caractérisation et identification des souches de bactéries lactiques.....	24
I.2.2. Etude de quelques aptitudes technologiques :.....	33
I.2.3. Etude des interactions bactériennes :.....	34

### résultats et discussion

<b>II.1 Isolement, purification, caractérisation et identification des bactéries lactiques :</b> .....	35
II.1.1. examen macroscopiques.....	35
II.1.2. examen microscopiques :.....	35
II.1.3. testes physiologiques et biochimiques :.....	36
II.1.4. Identification par profile de fermentation des sucres et logiciels :.....	37
<b>II.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :</b> .....	43
II.2.1. Pouvoir acidifiant:.....	43
II-2-2 Activités proteolytiques.....	46
II.2.3. Production de polysaccharides:.....	49
<b>II.3. Interactions bactériennes :</b> .....	52
<b>II.4. Reconstitution de levains lactiques :</b> .....	53
II.4.1. Pouvoir acidifiant :.....	53
II.4.2. Pouvoir protéolytique :.....	58
II.4.3. Production de polysaccharides :.....	58

- conclusion ..... 62

## LISTE DES ABREVIATION :

**AND** : acide dicarboxy- nucléique.

**ARN** : acide ribonucléique.

**pH** : potentiel d'hydrogène.

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone.

**°C** : degré celsius.

**C** : carbone.

**°D** : degré doronic.

**g** : gramme.

**H** : hydrogène.

**H<sub>2</sub>O** : Eau.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygéné.

**L** : litre.

**mg** : milligramme.

**Mm** : millimètre.

**mn** : minute.

**St** : *Streptococcus*.

**Lc** *Lactococcus*.

**Lu** : *Leuconostoc*

**Lb** : *Lactobacillus*

**ssp** : sub espèce

**ml** : millilitre

**h** : heure.

## LISTE DES FIGURES

Figure1: Différents isomères de l'acide lactique.....	2
Figure2: Méthode d'isolement et purification à partir de Beurre.....	26
Figure3: Méthode d'isolement et purification à partir du Raïb.....	27
Figure4: Méthode d'isolement et purification à partir de l'Ensilage.....	28
Figure5: Examen microscopique des bactéries lactiques.....	35
Figure6: Profil des tests biochimiques (souche E4 <i>leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i> ).....	37
Figure7: Profil fermentaire des sucres.....	39.
Figure8: Profil fermentaire des sucres.....	39
Figure9: Pouvoir acidifiant de quelques souches identifiées.....	44.
Figure10: Pouvoir acidifiant de quelques souches identifiées.....	45
Figure11: Activité protéolytique de quelques souches identifiées.....	47.
Figure12: Production de polysaccharides.....	59
Figure13: Pouvoir acidifiant des levains mixtes.....	57.
Figure14: Production de polysaccharides des levains mixtes.....	61

## LISTE DES TABLEAUX

1- TABLEAU 1 : Principaux caractères des streptocoques de la flore lactique.....	6.
2- TABLEAU 2 : Principaux caractères du genre <i>Leuconostoc</i> .....	7
3- TABLEAU 3 : Principaux caractères du genre <i>pediococcus</i> .....	8
4- TABLEAU 4: Principaux caractères du genre <i>lactobacillus</i> .....	11
5- TABLEAU 5 : Emploi des levains lactiques en industrie laitière, [8].....	12
6- TABLEAU 6 : Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés,[17].....	15
7- TABLEAU 7 : Principaux caractères physiologiques et biochimiques des souches isolées.....	40
8- TABLEAU 8 : Profil fermentaire des sucres.....	41
9- TABLEAU 9 : Les noms des espèces identifiées.....	42
10- TABLEAU 10 : Pouvoir acidifiant des souches isolées de beurre et raib.....	44.
11- TABLEAU 11 : Pouvoir acidifiant des souches isolées de l'ensilage.....	45
12- TABLEAU 12 : Activité protéolytique des bactéries lactiques purifiées.....	48
13- TABLEAU 13 : Production des polysaccharides par les bactéries lactiques purifiées.....	50
14- TABLEAU 14 : Interaction entre des bactéries lactiques.....	54.
15- TABLEAU 15 : Interaction inverse.....	55
16- TABLEAU 16 : Pouvoir acidifiant des levains mixtes des bactéries lactiques.....	56
17- TABLEAU 17 : Activité protéolytique des levains mixtes des bactéries lactiques.....	59.
18- TABLEAU 18 : Production des polysaccharides par les levains mixtes des bactéries lactiques.....	60



# Introduction

## **INTRODUCTION**

Voilà au moins quatre mille ans que l'homme se sert des bactéries lactiques pour la fermentation d'aliments. Ces bactéries sont utilisées dans le monde entier, en particulier dans les laitages fermentés comme par exemple le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre, les crèmes, la fabrication des vin (kéfir, koumiss), le saumurage des légumes, la boulangerie, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons

C'est ainsi qu'elles jouent maintenant et davantage encore dans le futur un rôle de locomotive dans les procédés biotechniques de fabrication des produits laitiers, donc il s'en améliorent ainsi la conservation et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celle de l'aliment à son état originel.

Aujourd'hui, les bactéries lactiques sont utilisées aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant), les cultures probiotiques favorisent le bon fonctionnement de notre flore intestinale, le marché mondial de ces produits se développe de plus en plus, pour répondre aux besoins d'un public de plus en plus à l'écoute de sa forme et de sa santé.

Les ferments lactiques utilisés à l'échelle industrielle dans notre pays sont coûteux à raison de leur importation en devise, et pour remédier à ce problème on a choisit ce sujet dont les objectifs sont les suivants :

Dans un premier temps on va faire l'isolement, la purification, la caractérisation et l'identification des souches lactiques à partir du beurre traditionnel, d'ensilage et du raïb. Dans un deuxième temps l'étude de quelques aptitudes technologiques des souches isolées et identifiées et l'étude des interactions bactériennes pour reconstituer des levains mixtes.

Notre travail vise la sélection de souches "INDIGENES" pouvant être utilisées comme ferments lactiques à l'échelle industrielle dans notre pays.

Analyse  
**bibliographique**

Chapitre I:  
**Les Bactéries lactiques**

**I-1 Définition:**

On considère comme bactéries lactiques toute bactérie capable d'excréter l'acide lactique D (-), L (+) ou DL. [9].



Figure 1: différents isomères de l'acide lactique, [9].

Elles ont été défini pour la première fois par ORLA JENSEN en 1919, et réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique, la fermentation est dite: homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé (voie d'EMBDEN MEYERHOF PARNAS ), et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : acide lactique, éthanol, CO<sub>2</sub> ... (voie de DICKENS-HOREKER et D'ENTNER-DEUDOROFF). [14]

**I-2 Propriétés générales:**

La propriété principale des bactéries lactiques est la production de l'acide lactique, mais il convient de prendre en compte de nombreux caractères microbiologiques: [1]

- Elles sont Gram (+) positif.
- Elles ne sporulent pas.
- Elles sont pour la plupart immobiles.
- Elles sont aéroanaérobies facultatives. (microaérophiles).
- Elles sont allongées (lactobacilles) ou sphériques (streptocoques).
- Elles sont catalase (-) négatif.
- Elles sont généralement oxydase (-) négatif.
- Elles ne réduisent pas le nitrate en nitrite.

Leurs capacités de biosynthèse est faible ce qui explique leurs polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras.

Elles sont dépourvues de cytochromes, étant incapables d'effectuer la synthèse de noyau HEME de porphyrines, de ce fait elles sont incapables de respirer mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire. [14]

### **I-3 Origine:**

La présence des bactéries lactiques est révélée dans de nombreux milieux riches en nutriments, comme la multitude de produits alimentaires (laits, viandes, et produits végétaux). [8]

Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, les animaux et les oiseaux. On peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales et les poussières, mais aussi de l'ensilage du foin et des grains. Les espèces de genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature, on les trouve dans les végétaux où elles assurent l'acidification de l'ensilage. On les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme car *Lactobacillus* résiste aux sels biliaires, peu d'espèces ont un caractère pathogène. Les espèces du genre *Pediococcus* ne se rencontrent pratiquement que sur les plantes. [8]

### **I-4 Classification:**

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance différente. [14]

Le rassemblement de ces genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire; l'analyse de la séquence nucléotidique de leurs ARN ribosomique (ARNr) permet de les réunir dans un même grand groupe phylogénétique.

Les bactéries lactiques appartiennent au cinq principaux genres [17]

- *Lactococcus* (Lc).
- *Streptococcus* (Sc).
- *Leuconostoc* (Ln).
- *Pediococcus* (Pc).
- *Lactobacillus* (Lb).

**I-4-1- Genre *Streptococcus*:**

Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques. [14]

Les espèces ont une forme ronde et sont assemblés par deux ou en chaîne, très exigeants du point de vue nutritionnel. [6]

Leur reproduction s'effectue parallèlement à un seul plan, ce qui conduit à des associations des cellules par paires (diplocoques), en chaînes et en chaîne de cellules par paires (streptocoques). [9]

Les techniques d'investigation de la biologie cellulaire ouvrent la voie à une taxonomie plus rigoureuse, ces techniques ont trouvés une application dans la sélection des souches à hautes performances technologiques. [16]

Le pourcentage en base G et C de l'ADN de *Streptococcus* est entre 34 – 36 %. [14]

La plupart des espèces sont thermophiles, leur fermentation est homolactique. L'espèce *Streptococcus thermophilus* se différencie des autres par son habitat (lait et produit laitiers) et son caractère non pathogène. [17]

La classification de BERGEY fait apparaître 29 espèces principales auxquels viennent s'ajouter 8 espèces "nouvellement décrites". [17]

Les 29 espèces sont réparties en 6 groupes:

- Streptocoques hémolytiques pyogènes.
- Streptocoques de la bouche.
- Streptocoques fécaux ou les entérocoques.
- Streptocoques lactiques ou lactocoques.
- Streptocoques anaérobies.
- Autres streptocoques.

**I-4-2- Genre *Lactococcus*:**

Le genre *Lactococcus* récemment défini doit être considéré dans le genre *Streptococcus*. Ce sont des cellules sphériques, mesophiles, peuvent quelques fois s'allonger, elles produisent l'acide lactique L (+). [14]

Les espèces de ce genre sont associés à nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, largement présent dans le lait et les produits laitiers.

Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce possèdent la particularité d'être mobile. [17]

Dans le groupe des lactocoques on distingue deux espèces:[17]

*Lactococcus lactis* et *Lactococcus raffinolactis* comme le fait le manuel de BERGEY 1986 sous l'ancienne dénomination. *Streptococcus lactis* et *Streptococcus raffinolactis*.

Les espèces *Lactococcus cremoris* et *Lactococcus diacetyllactis* sont considérées comme sous espèces de *Lactococcus lactis*. [17]

Qui ainsi en comporte:

- *Lactococcus lactis* ssp *lactis*.
- *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*.
- *Lactococcus lactis* ssp *diacetyllactis*.

#### I-4-3- Le genre *Leuconostoc*:

Il rassemble les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles.

Généralement capsulés, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et l'éthanol, certains espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère une activité aromatique importante, elles ne sont pas pathogènes, ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides, sucrés et dans les végétaux. [17]

Les *Leuconostoc* sont mésophiles, la température optimale de croissance se situe autour de 25°C. Aucune espèce ne cultive à 45°C, *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* ne pousse pas à 37°C, tout comme *Leuconostoc oenos*, pour ces souches, la température minimale de développement est de 10°C. [9]

Leur pourcentage en base G et C (GC%) de l'ADN est compris entre 36 – 43 %. [14]

La classification de BERGEY fait apparaître 04 espèces: [14]

➤ *Leuconostoc mesenteroides* qui comporte trois sous espèces:

- *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp *dextranicum*
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*

➤ *Leuconostoc lactis*

➤ *Leuconostoc oenos*.

➤ *Leuconostoc paramesenteroides*



TABLEAU 1: Principaux caractères des Streptocoques de la flore lactique [ 9].

Tests	<i>Lc. clactis</i> ssp			<i>Lc. raffinolactis</i>	<i>St. thermophilus</i>
	<i>Lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>diacetylactis</i>		
Morphologie	0,5-1 $\mu$	0,5-1 $\mu$ m	0,6-1 $\mu$ m	ND	0,7-0,9 $\mu$ m
Culture à 10°C	+	+	+	+	-
Culture à 45°C	-	-	-	-	+
Culture en lait à 0,1%de BM	+	+	+	ND	-
Culture en lait à 0,3%de BM	+	+	+	-	-
Culture en NaCl 4%	+	+	+	-	-
Culture en NaCl 6,5%	V	-	V	-	-
Réductase	+	+	+	+	-
Citratase	-	-	+	ND	-
Acétoïne	-	-	+	ND	-
ADH	+	-	+	-	-
Hémolyse	gamma	gamma	gamma	gamma	alpha
Groupe sérologique	N	N	N	N	-

+ : test positif

- : test négatif

ND : Non Déterminé

BM: bleu de Méthylène.

TABLEAU 2 : Principaux caractères des *Leuconostoc* [9]

	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp			<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
	<i>mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	<i>cremoris</i>	<i>paramesenteroides</i>	<i>lactis</i>	<i>oenos</i>
Culture à 10°C	+	+	+	+	+	+
Culture à 37°C	+	+	-	+	+	-
Culture à 45°C	-	-	-	-	-	-
Heterofermentation	+	+	+	+	+	+
Citratase	-	-	+	-	+	+
Formation de dextrans	+	+	-	-	-	-
Arginine deshydrolyse	-	-	-	-	-	-

(+): test positif. (-): test négatif. *Ln*: *Leuconostoc*

#### I-4-4- Le genre *Pediococcus*:

Ce sont des cellules sphériques, elles peuvent être en paires et en tétrades, les *Pediococcus* sont homofementaires, produisent de l'acide lactique DL ou L(+), elles sont mesophiles, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose. Ce sont des agents de dégradation des brasseries (*Pc. damnosus*), et causent aussi des altérations (viscosité) dans les produits végétaux et parfois les viandes et les poissons. [14]

La classification de BERGEYS recense 08 espèces dans le genre [9] :

- *Pc. damnosus*.
- *Pc. pmulus*.
- *Pc. inopinatus*.
- *Pc. dextranicus*.
- *Pc. acidilactici*.
- *Pc. holophilus*.
- *Pc. urinacequi*.



Ces bactéries ont la particularité de se reproduire alternativement suivant deux plans perpendiculaires. [9]

Leur pourcentage en base G et C (GC%) est entre 34-42% [14]

TABLEAU 3 : Principaux caractères des *Pediococcus* [9]

	<i>Pc.</i> <i>damnosus</i>	<i>Pc.</i> <i>parvulus</i>	<i>Pc.</i> <i>inopinatus</i>	<i>Pc.</i> <i>dextrinicus</i>	<i>Pc.</i> <i>pentosaceus</i>	<i>Pc.</i> <i>acidilactis</i>	<i>Pc.</i> <i>holophilus</i>	<i>Pc.</i> <i>urinacequi</i>
Acide lactique	DL	DL	DL	L(+)	DL	DL	L(+)	L(+)
Croissance à 37°C	-	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 50°C	-	-	-	-	-	+	-	-
Croissance à pH 4.2	+	+	-	-	+	+	-	-
Croissance à pH 8.5	-	-	-	-	±	±	+	+
Croissance en								
NaCl 4%	-	+	+	+	+	+	±	+
6.5%	-	+	±	-	+	+	+	+

(+): test positif. (-): test négatif.

**I-4-5- Le genre *Lactobacillus*:**

Il s'agit de bacilles souvent allongés, parfois groupés en paires ou en chaînes, certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatiles, de l'éthanol et CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique.

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille de Lactobacillaceae. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries. [6]

Ce genre est caractérisé par l'hétérogénéité de ces espèces car le pourcentage en base G et C (GC%) de leurs ADN est compris entre 32-53% [14]

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par ORLA-JENSEN en 1919 en trois groupes. [6]

**-Groupe I:**

**Thermobacterium** : homofermentaire et thermophile, ce groupe comprend 15 espèces, les plus fréquentes sont:

- *Lb. helveticus*.
- *Lb. yugerti*.
- *Lb. bulgaricus*.
- *Lb. lactis*.
- *Lb. acidophilus*.
- *Lb. leichminii*.
- *Lb. delbrueckii*.
- *Lb. kofirofaciens*.

**- Groupe II:**

**Streptobacterium**: homo fermentaire et mésophile, il comprend 11 espèces parmi lesquelles

- *Lb. casei*
- *Lb. plantarum*
- *Lb. curvatus*.
- *Lb. hilgardii*.

**- Groupe III:**

**Betabacterium:** hétérofermentaire, soit mésophile, soit thermophile, les espèces les plus fréquentes sont:

- *Lb. buchneri*.
- *Lb. bravis*.
- *Lb. kefir*.
- *Lb. hilgardii*.

Le tableau suivant regroupe les principaux caractères des *Lactobacillus*.

TABLEAU 4 : Principaux caractères des *Lactobacillus*. [9]

	Croissance à 15°C	Croissance à 45°C	Lactose	Saccharose	Gluconat	Ribose	Xylose	ADH
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>delbrueckii</i>	-	+	-	+	-	-	-	±
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	-	+	+	+	-	-	-	±
<i>Lb. acidophilus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. gasseri</i>	-	+	±	+	-	-	-	-
<i>Lb. crispatus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	±	-
<i>Lb. casei</i> ssp <i>casei</i>	+	-	±	+	+	+	-	-
<i>Lb. casei</i> ssp <i>pseudopiantarum</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. casei</i> ssp <i>tolerans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i> ssp <i>rhamnosus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. sake</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	+	-	±	-	+	+	-	-
<i>Lb. bavaricus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Lb. bif fermentans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lb. brevis</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. buchneri</i>	+	-	±	±	+	+	±	+
<i>Lb. Fermentum</i>	-	+	+	+	+	+	±	+
<i>Lb. kefir</i>	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Lb. confusus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lb. viridexens</i>	+	-	-	±	-	-	-	-

Chapitre III:  
Rôles et intérêts  
**des bactéries lactiques**  
**en industries alimentaires**

**II-1 introduction:**

La fabrication où interviennent des actions microbiennes nécessite une microflore spécifique souvent complexe. La plupart des aliments fermentés font intervenir des bactéries lactiques soit en tant qu'agent principale de la fermentation, soit en tant qu'agent secondaire. [19]

**II-2 produits laitiers:**

Il s'agit du domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques, du fait de la contamination fréquente des bactéries lactiques dans le lait et de leur capacité à utiliser le lactose.

Les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés. [17]

**TABLEAU 5 Emploi des levains lactiques en industrie laitière[11]**

	Espèces	Produits	
01	<i>Streptococcus lactis</i> ..... <i>Streptococcus diacetylactis</i> ..... <i>Streptococcus cremoris</i> ..... <i>Leuconostoc</i> .....	Fromage à patte pressé Fromage à patte molle. Fromage à patte persillé. Feta. ...Etc	
	<i>Streptococcus cremoris</i> ..... <i>Streptococcus diacetylactis</i> ..... <i>Leuconostoc cremoris</i> .....		Beurre Babeurre fermenté
	<i>Streptococcus lactis</i> ..... <i>Lactobacillus brevis</i> ..... <i>Leuconostoc</i> .....		
	<i>Streptococcus lactis</i> ..... <i>Lactobacillus casei</i> ..... <i>Lactobacillus cremoris</i> .....		
	<i>Streptococcus thermophilus</i> ..... <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ...	yaourt	
	<i>Streptococcus thermophilus, lactobacillus helveticus</i> .... <i>Lactobacillus lactis, lactobacillus bulgaricus</i> .....	Fromage à Patte presse, grana	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> → lait acidifié, kéfir <i>Brevibacterium hineus</i> → fromage à patte molle, "morge" descontés Et gruyers <i>propionibacterium</i> → fromage à patte cuite pressé (ouverture)		

(01) : emploi des levains lactiques mesophiles en industrie laitière.



(02) : emploi des levains lactiques thermophiles en industrie laitière.

(03) : emploi des levains d'affinage.

### II-2-1 laits fermentés:

Le lait cru laissé à la température ambiante coagule spontanément sous l'influence de la fermentation lactique; ce procédé ancestral de conservation du lait est utilisé actuellement pour obtenir toute une gamme de préparations, très répandues appréciées pour leurs qualités organoleptiques [13]

- **Le yaourt:**

Le yaourt est obtenu par fermentation du lait réalisé par deux espèces de bactéries lactiques: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. [17]

Les bases scientifiques et technologiques de la fabrication du yaourt ont fait l'objet d'un ouvrage exhaustif. Le yaourt est à la fois le lait le plus consommé et le mieux connu, ce qui légitime qu'il soit traité à part. [19] et [2]

### II-2-2 Le kéfir et Koumiss :

Ce sont des laits fermentés, mousseux et alcoolisés, d'origine balkanique. [13]

Ils sont fabriqués à partir du lait de différentes espèces animales (vaches, chèvres, chamois) fermenté par une flore complexe associant levure et bactéries lactiques telles que *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc* [17]

### II-2-3 Beurre et crème :

Le goût particulier du beurre ou goût de noisette est dû à la fermentation de la crème. Le ferment du beurre est composé de souches acidifiantes et aromatisantes. Dans une première étape, le phénomène dominant est la production d'acide lactique par l'espèce *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris* ; l'acidification provoque le surissement de la crème nécessaire à la bonne séparation de la matière grasse et du petit lait. Ensuite les composants aromatiques sont formés par *Streptococcus diacetylactis* et *Leuconostoc citrovorum* ; ils sont essentiellement composés de diacétyl provenant de l'oxydation de l'acétoïne produite par les micro-organismes. [13]

#### II-2-4 Fromage :

Les levains mesophiles constitués de *Lactococcus* et *Leuconostoc* participent à la fabrication des fromages frais, fromages à patte molle, persillée ou pressé. Les sous espèces *lactis* et *cremoris* de *Lactococcus lactis* sont utilisées pour leurs propriétés acidifiante. Les sous espèces *lactis biovar diacetylactis* et plusieurs espèces de *Leuconostoc* sont des souches aromatisantes que l'on retrouve dans tous les types de fromage. Les levains thermophiles associant *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii* appartiennent à la flore des fromages à patte cuite (emmental gruyère). [17]

#### II-3 Panification :

Les levains de panification sont constitués d'une flore sauvage issue de la farine. Elle comprend des levures qui assurent la fermentation mais également une flore bactérienne variée au sein de la quelle les bactéries lactiques sont largement représentées, les *Lactobacillus* sont majoritaires, avec les espèces *plantarum*, *brevis*, *casei* ou *sanfrancisco*. [17]

#### II-4 produits carnés :

Les bactéries lactiques ajoutés sont des *Lactobacillus*, avec trois espèces principales : *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus plantarum*, des *Pediococcus damnosus*, *pentosacus* et *acidilactici* interviennent également.

Ces bactéries interviennent comme agents de fermentation dans les préparations des viandes salées, épicées, et ne subissant aucun traitement thermique d'assainissement comme les saucissons. [17]

#### II-5- produits végétaux :

La fermentation lactique des végétaux est une technique largement utilisée dans les pays ne bénéficient pas, d'une structure industrielle. Les bactéries lactiques interviennent dans la préparation des produits végétaux fermentées sont : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis*. [5].

Ces bactéries se trouvent naturellement présente à la surface des feuilles des choux. D'autre préparation à base de fruits ou légumes salés (olives, concombres) font intervenir

une fermentation lactique, spontanée réalisé par la flore naturelle, ou l'on retrouve d'autres espèces ainsi que des *Pediococcus*. [17]

**TABLEAU 6 : Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés [17 ]**

Laits fermentés	yaourt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . <i>Streptococcus thermophilus</i> . (1) Acidification- texture- arômes (Acetaldehyde)
	Enrichis en bactéries	Idem yaourt+ <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ou <i>Lb. casei</i> .(1) Rôle nutritionnel.
	Kéfir koumiss	<i>Lb. brevis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lc. lactis</i> . (2) Acidification- texture- arômes.
	Lait ribot Butter milk	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> (1) Texture- arômes.
Beurre et crème	Beurre et crème	<i>Lc. Lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> (1) Arômes. (diacétyle).
Fromage	Frais ou à patte molle	<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>Cremoris. Lactis, diacetylactis</i> (1) Acidification : formation du caillé.
	A patte persillé	<i>Leuconostoc</i> (2) Formation d'ouverture facilitant la croissance de <i>Penicillium</i> .
	A patte pressé	<i>Lactobacillus. Lactococcus</i> (2) Arôme au cours de la maturation
	A patte pressé cuite (gruyère, emmental)	<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> . <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> (1) Acidification...

(1): ferment ajoutés ; (2) : flore naturelle.

Chapitre III:  
**Aptitudes technologiques**  
**des bactéries lactiques**

### III.1. Acidification :

Le rôle primaire fondamental des bactéries lactiques est d'acidifier plus ou moins le lait selon le produit recherché. [15]

La dégradation de lactose, est le fait marquant de la transformation du lait en produit laitiers. Le pH atteint le  $pH_i$  de la caséine, le complexe calcium-caseines- phosphate est déstabilisé, car les caséines sont proches de leurs point isoélectrique (pH : 4.6), ce qui entraîne la prise en masse du produit et la formation d'un coagulum assez fragile. [5].

Le pH acide évite de plus le développement de micro-organismes de contamination ou entraîne une réduction de leur nombre. [15]

### III.2. Rôle de la protéolyse:

Dans les fromages à pattes pressées, à flore essentiellement lactique, l'activité des enzymes protéolytiques de bactéries lactique est fondamentale, car elle complète l'action de la présure restant dans la caille et celle de la plasmine (enzyme naturelle du lait).

La protéolyse due aux bactéries lactique sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour des nombreux produits d'arôme. [8]

### III.3. Production de polysaccharides :

Certains souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser des exopolysaccharides, glucanes (dextrane) et fructosanes (levanes), qui constituent la capsule cellulaire, ces macromolécules contribuent à modifier la texture de produits dans lesquels se développent les souches compétentes [9]

#### III.3.1. Cas des bactéries thermophiles :

Pour la fabrication des yaourt, on constate, que l'onctuosité du produit peut être amélioré en utilisant les souches produisant un épaissement du lait. Ces souches augmentent la viscosité du produit en améliorant sa texture.

Selon les souches, les concentrations produites, varient de 50 à 400 ml du lait.

Le galactose est le monomère majeur alors que le glucose et le rhamnose sont présentés en plus petite quantité chez *Lb. bulgaricus*, ou le glucose, xylose, arabinose, rhamnose et mannose chez *St. thermophilus*. [8]

Etude  
**Expérimentale**

## I. Matériel et Méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de JIJEL.

### I.1. Matériel :

#### I.1.1. Matériel biologiques :

Pour l'isolement des bactéries lactiques, on a utilisé trois substrats biologiques d'origine Jijilienne à savoir :

**I.1.1.1. Beurre :** On a utilisé deux types de beurre, fraîche et de quelques jours de maturation issue de barattage du lait cru de la région de AOUANA.

**I.1.1.2. Raïb :** C'est du raïb issu de lait de vache autochtone

**I.1.1.3. Ensilage :** Il a été préparé au niveau de laboratoire de la microbiologie, à partir d'un mélange d'herbes vertes.

**I.1.1.4. Lait écrémé :** C'est du lait utilisé pour la fabrication du lait pasteurisé et du yaourt, fourni par l'unité DIPROLAIT.

#### I.1.2. Milieux de cultures :

Au cours de notre étude, nous avons utilisé les milieux suivants :

- Milieu MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) : liquide et gélose, proposé pour la culture de lactobacilles.
- Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE, 1975) : il convient bien à la culture des Streptocoques (lactocoques, *Leuconostoc* et *pediocoques*).
- Bouillon hypersalé (préparé au laboratoire) : à 4% de NaCl. et 6.5% de NaCl pour éliminer les streptocoques fécaux.
- Lait de SHERMAN : à 1% et 3% de bleu de méthylène pour étudier la sensibilité au Colorants (préparé au laboratoire).
- Milieu GIBSON ABD-EL-MALEK : pour la recherche de type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Milieu hypersaccharosé : pour la recherche de la production de polysaccharides (Préparé au laboratoire).
- Milieu Y.M.A (Yeast Milk Agar) : pour la recherche de l'activité protéolytique (préparé au Laboratoire).

- Lait tournesolé : préparé au laboratoire pour le test de réductase.
- Milieu CLARK et LUBS : pour la recherche de l'acétoïne.
- Milieu citrate de SIMMONS : l'utilisation de citrate comme seul source de carbone.
- ADH : pour la recherche de l'arginine déshydrogénase.
- Milieu M.E.V.A.G sans sucre (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) pour la réalisation des profils de fermentation des sucres.
- Gélose au sang de cheval : elle a été préparée au niveau de laboratoire pour la caractérisation du type d'hémolyse.

#### I.1.3. Les sucres :

Pour établir le profil fermentaire des souches on a utilisé les 22 sucres suivants :  
Arabinose, Rhamnose, Galactose, Maltose, Adonitol, Dulcitol, Dextrine, Mannose, Salicine, Levulose, Sorbose, Melibiose, Lactose, Raffinose, Glycérol, Glucose, Fructose, Inositol, Mannitol, Saccharose, Ribose et Amidon.

#### I.1.4. Autres produits :

Au cours de notre travail nous avons utilisé :

- Violet de gentiane
- Fushine
- Lugol
- Alcool
- Bleu de méthylène
- La soude (NaOH) N/9
- Phénol phtaléine
- VP<sub>I</sub> solution alcoolique d' $\alpha$  naphthol
- VP<sub>II</sub> solution aqueuse de soude 16%
- Teinture de tournesole
- Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour le test catalase
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Tween 80 additionné au milieu MRS
- Les disques de papier WATMAN N°4°
- Centrifugeuse (55702 Bio block scientific)



- Autoclave ( SHI AVX electronic)
- Bain marie (GERHARDT)
- Balance (DENYER instrument XP -600)
- Agitateur magnétique (MEIDOLPH, MR 3001)
- pH mètre (MICROPROCESSOR pH mètre, pH 211)
- Etuve (WTB binder)
- Four pasteur pour la stérilisation des verreries (CONTROLS)
- Microscope optique (OLYMPUS)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Burette

## **I.2.Méthodes :**

### **I.2.1. Techniques d'isolement, purification, caractérisation et identification des souches de bactéries lactiques.**

#### **I.2.1.1. Préparation des échantillons : [3]**

##### **I.2.1.1.1. Beurre :**

La préparation de l'échantillon est un peu spéciale : les dilutions sont réalisées à partir d'une phase aqueuse qui est obtenue par fusion puis centrifugation de l'échantillon, les micro-organismes sont entraînés dans la phase aqueuse . Le prélèvement est effectué à l'aide d'une spatule stérile, après avoir enlevé une couche superficielle.

Dans un flacon stérile on a introduit quelques grammes de beurre qu'on porte à 45°C au bain marie jusqu'à fusion complète, puis on transvase stérilement dans des tubes de centrifugations stériles et on centrifuge à 3000 tours pendant 15 mn, cette dernière permet de distinguer trois phases :

1. Phase supérieure contenant la matière grasse.
2. Phase intermédiaire qui est la phase liquide.
3. Le culot.

Avec une pipette pasteur on a prélevé la phase liquide (intermédiaire) qui représente la solution mère, la première dilution décimale ( $10^{-1}$ ) est obtenu en ajoutant 1ml de la solution mère dans 9ml d'eau physiologique stérile. A noter qu'on a utilisé le beurre à deux dates de maturation différentes.(Figure 2 )

**I.2.1.1.2. Raïb :**

Pour la préparation des dilutions ; la première dilution ( $10^{-1}$ ) est obtenue en ajoutant 1 ml de raïb au 9 ml d'eau physiologique stérile et on renouvelle le processus à partir de la dilution ( $10^{-1}$ ) pour l'obtention de la dilution ( $10^{-2}$ ), à partir de cette dernière on obtiendra la dilution ( $10^{-3}$ ). On change de pipette après chaque utilisation.(Figure 3 )

**I.2.1.1.3 Ensilage :**

Nous avons ramené une gamme d'herbes verts de quelques plantes du jardin de l'université, on les a coupé dans un récipient puis on a versé un volume d'eau distillée . On exerce une certaine pression en déposant un poids sur le contenu du récipient pour faciliter l'exsudation de la sève.

L'échantillon est conservé pendant 8 jours à température ambiante .Une seule dilution est préparée à partir de la sève fermentée ( $10^{-1}$ ). (Figure 4 )

**I.2.1.2. Isolement : .[ 7]**

Pour l'isolement des bactéries lactiques, il convient de respecter les conditions d'anaérobiose et la température d'incubation.

Les boîtes de PETRI contenant la gélose MRS, gélose M<sub>17</sub> et gélose nutritive préalablement coulées et séchées, sont ensemencées à partir de la solution mère et des dilutions déjà préparées, l'incubation est faite à 37 °C pendant 24h. Chaque colonie bien distincte est récupérée puis repiquée soit dans le bouillon lactosé, le bouillon nutritif ou bouillon M<sub>17</sub>.

Après 24 h d'incubation à 37°C, les cultures sur le bouillon présentant un trouble homogène sont soumises à une coloration de GRAM (les lactiques sont à GRAM positive)

**I.2.1.3. Purification : .[7]**

La purification consiste a réalisé des repiquages successifs sur les bouillons (MRS et M<sub>17</sub>) pour des colonies bien distinctes. Dès qu'on obtient des colonies homogènes (de même taille, même forme et même couleur), on arrête la purification, puis on les a conservé dans le réfrigérateur sur bouillon nutritif.

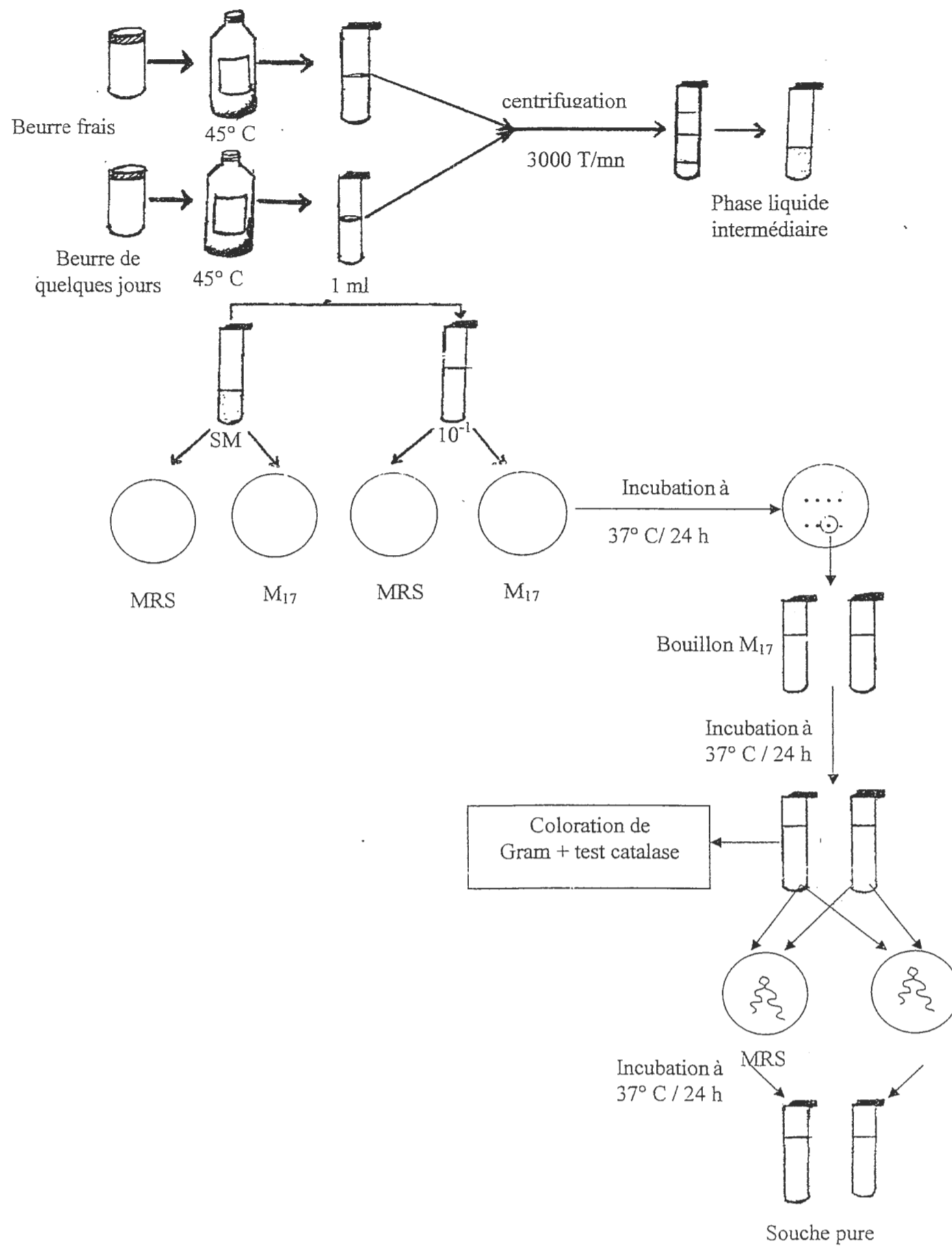


Figure 2 : Méthode d'isolement et de purification à partir de beurre.

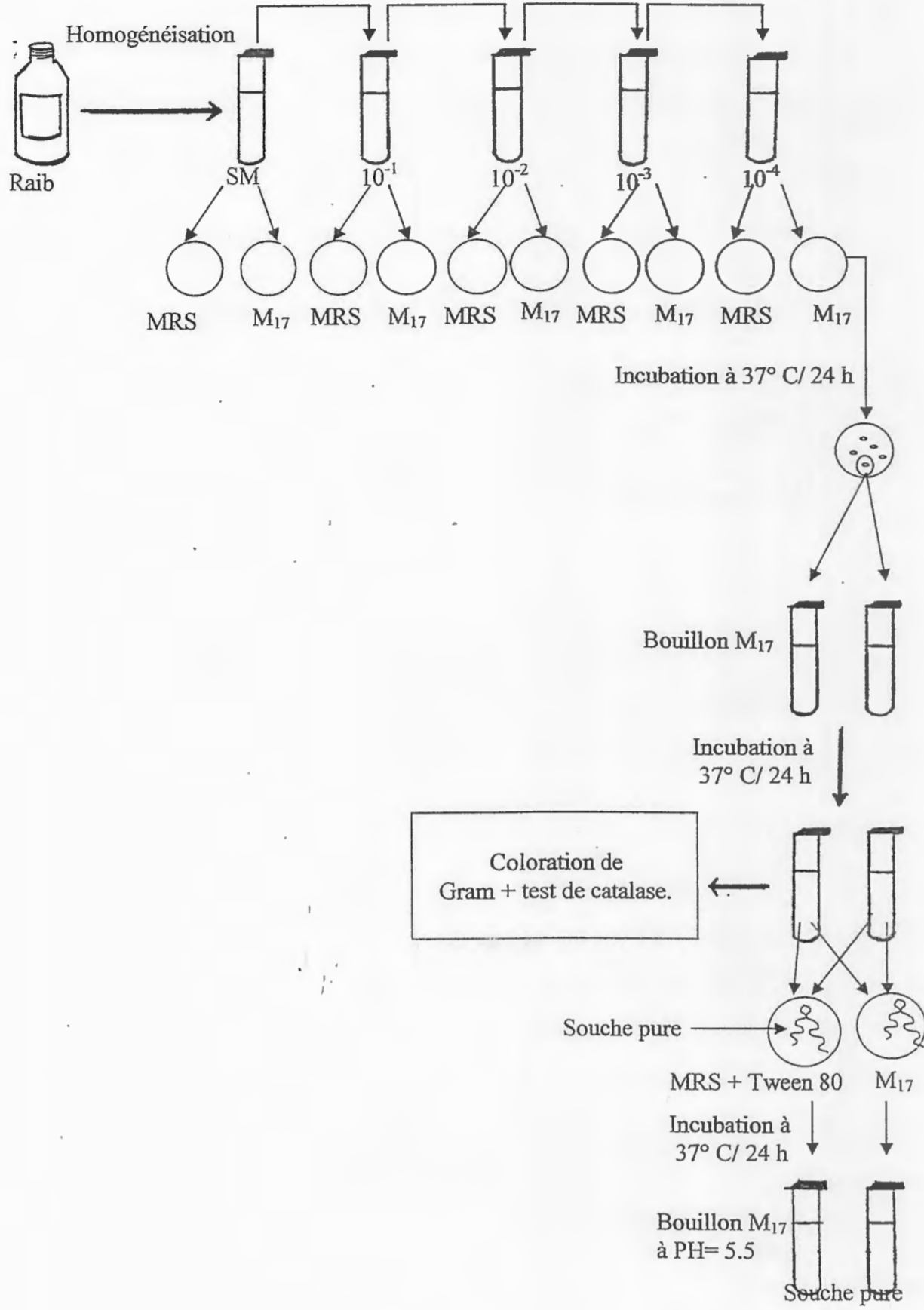


Figure 3 : Méthode d'isolement et purification à partir de Raib.

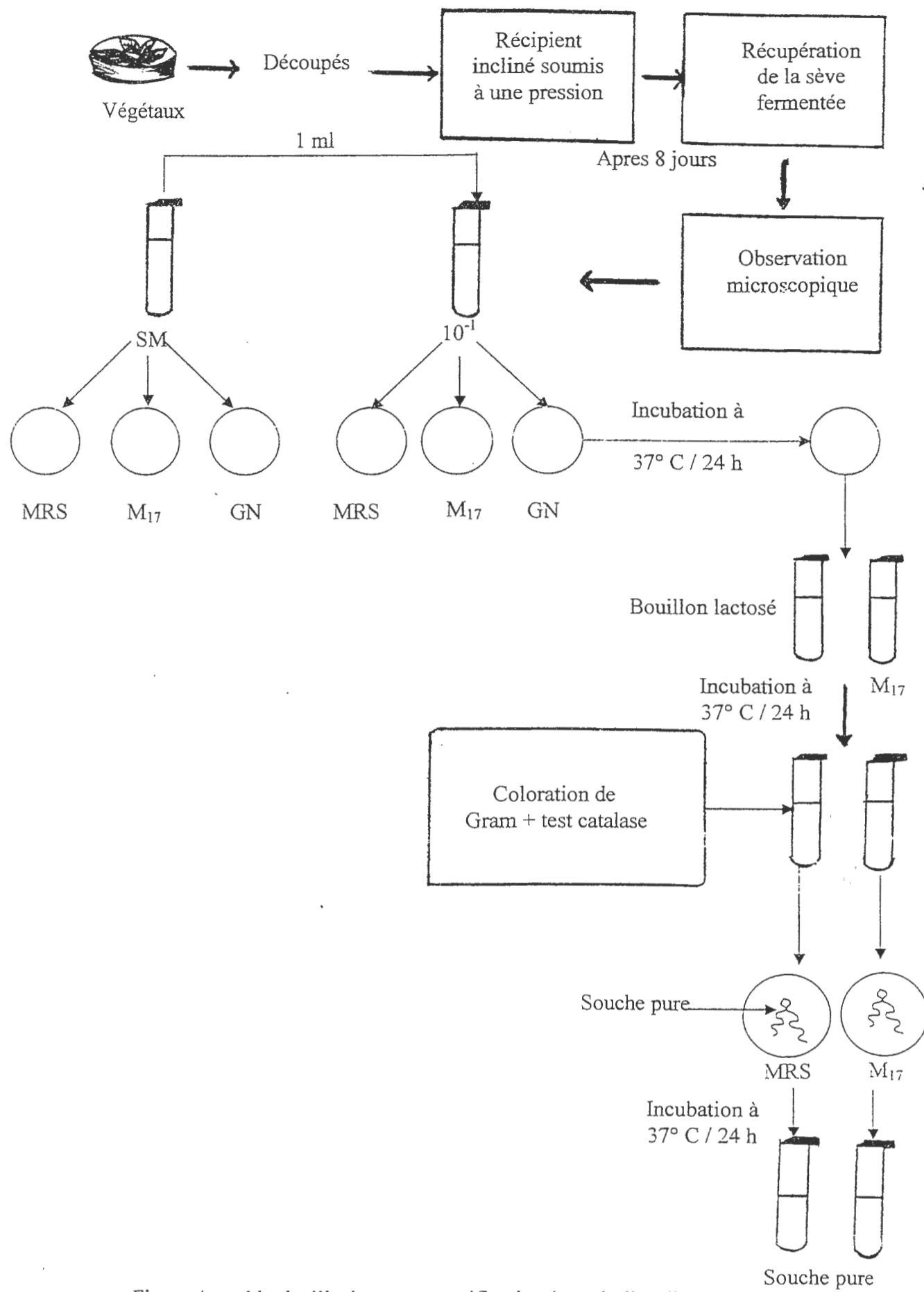


Figure 4 : méthode d'isolement et purification à partir d'ensilage.

**I.2.1.4. Identification : [7], [9]**

Pour identifier les souches purifiées, nous avons appliqué différents tests morphologiques, physiologiques et biochimiques, c'est à dire on applique les techniques classiques

**I.2.1.4.1. Examen Macroscopique :**

Ce test vise à voir la taille des colonies, leur couleur et leur forme sur les boites de PETRI, après incubation à 37°C pendant 24h.

**I.2.1.4.2. Examen Microscopique :**

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram et la coloration simple, celles ci permettent successivement de faire la différentiation entre le Gram positif et le Gram négatif, les bâtonnets et les coques.

**- Technique de coloration de GRAM :**

- Placer la lame préparée horizontalement et faire un étalement du germe puis fixer par la chaleur ;
- Ajouter le violet de gentiane pendant 1 mn, jeter le colorant ;
- Ajouter le Lugol pendant 1 mn ;
- Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes ;
- Ajouter le deuxième colorant, la fuschine et laisser agir pendant 1 mn, laver à l'eau ;
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile de cèdre puis on passe à l'observation microscopique.

nous l'avonsensemencé par les souches à tester et on a ajouté un bouchon de gélose à la surface.

L'incubation est faite à 37°C pendant 24h.

Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose, par contre le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse le bouchon vers le haut du tube.

#### ◆ Hémolyse :

On a préparé au préalable la gélose au sang du cheval (250 gouttes du sang de cheval par flacon [250ml]), que l'on coule sur boîtes de PETRI, après solidification de la gélose, onensemence en strie, et on incube à 37°C pendant 24h.

Les colonies de streptocoques peuvent présenter l'un ou l'autre des aspects suivants :

✓ Colonies entourées d'une zone franche d'hémolyse, il s'agit de Streptocoques Beta-hémolytique.

✓ Le milieu entourant la colonie devient verdâtre ce qui résulte la production de peroxyde d'hydrogène. On est en présence d'une hémolyse alpha ( $\alpha$ ).

-Enfin le milieu n'est pas modifié : c'est une hémolyse gamma ( $\gamma$ ).

✓ Les lactocoques ainsi que les *Leuconostoc* ne sont pas hémolytiques.  
*Streptococcus thermophilus* peut donner une hémolyse alpha.

#### ◆ Profil fermentaire :

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches purifiées à fermenter quelques sucres, le test est réalisé sur milieu M.E.V.A.G sans sucre. Onensemencé chaque souche dans un tube de M.E.V.A.G contenant le sucre, en sujet et pour favoriser l'anaérobiose, on a versé une quantité suffisante de l'huile de paraffine stérile. Les résultats sont lus après 24h d'incubation.

A noter que ce test a été réalisé sur 22 sucres.

**I.2.2. Etude de quelques aptitudes technologiques :****I.2.2.1. Etude de pouvoir acidifiant : [6]**

Pour l'étude de l'aptitude acidifiante de nos souches, nous avons procédé à la détermination du pH et au dosage de l'acide lactique

**Détermination de l'acide lactique :**

Chaque souche estensemencée dans un flacon contenant 120 ml de lait écrémé stérile, puis incubé à 37°C. Les mesures répétées (deux répétitions) se font à 0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h.

L'acidité est déterminée par dosage titrimétrique de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium en présence de phénol phtaléine, cette détermination se fait par une prise d'essai de 10 ml de lait. Pour se faire, on a ajouté 4 gouttes de phénol phtaléine pour chaque 10 ml de lait, on a homogénéisé puis on a titré avec de la soude dornic jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pale persistante.

L'acidité en degré dornic (°D) est déterminée par la formule suivante :

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

V : volume de NaOH (N/9)

La mesure du pH consiste à plonger l'électrode du pH mètre dans l'échantillon, et lire la valeur enregistrée sur écran.

**I.2.2.2. Etude de pouvoir protéolytique : [ 18 ]**

On a testé cette activité sur le milieu YMA qu'on a préparé au laboratoire, nous avons appliqué le même principe de l'antibiogramme : des disques de papier WATMAN N°4 sont imbibés dans la suspension bactérienne qu'on a purifiée préalablement, puis on les a déposés sur la gélose YMA déjà coulée et solidifiée sur des boîtes de PETRI. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture des résultats est effectuée par la mesure de diamètre de la zone claire au tour des disques



**I.2.2.3. La production de polysaccharides : [ 9 ]**

Nous avons ensemencé aseptiquement les différentes suspensions bactériennes en stries sur le milieu hypersaccharosé que l'on a préparé préalablement au laboratoire, ensuite on les a incubé à 37°C pendant 24h.

La production de polysaccharides se manifeste par la présence de colonies larges et gluantes.

**I.2.3. Etude des interactions bactériennes : [9]**

Pour réaliser ce test on a appliqué le principe de l'antibiogramme sur milieu solide, nous avons choisis 10 souches de l'ensemble de la collection.

Après avoir coulé la gélose MRS dans des boites de PETRI et après solidification on a ensemencé la souche à tester par étalement, on laisse sécher, puis on dépose les disques imbibés des autres souches en surface et on incube à 37°C pendant 24h.

On refait le même test, pour le croisement inverse. La lecture est en rapport avec l'apparition des zones de lyse au tour des disques.

**I.2.4. Reconstitution des levains lactiques :**

C'est on se basant sur les résultats de l'interaction bactérienne qu'on a reconstitué des levains mixtes, composé de bacilles et coques puis on a évalué quelques aptitudes technologiques à savoir :

- Le pouvoir acidifiant
- Le pouvoir protéolytique
- La production de polysaccharides

Ces tests sont réalisés de la même manière déjà décrite en [1-2-2]

## II.1. Isolement, purification, caractérisation et identification des bactéries lactiques.

### II.1.1. Examen macroscopique

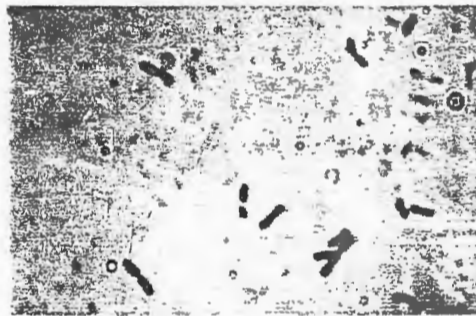
On a observé des colonies de différentes tailles, bien isolées, de couleur blanchâtre et jaunâtre brillante, à pourtour régulier, certaines ont des formes circulaires et lenticulaires (convexe). Toutefois sur chaque boîte, on a observé des colonies de même couleur et même taille témoignent la pureté des souches.

### II.1.2. Examen microscopique

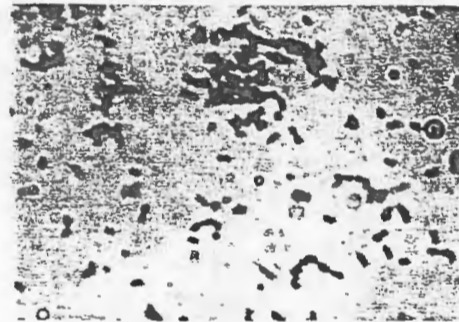
Après la purification des souches et la recherche de la catalase, les observations au microscope optique révèlent deux formes de bactéries lactiques :

- Des bâtonnets disposés en chaîne plus ou moins longues, ce sont des lactobacilles qui représente 14.28 % de la collection lactique.
- Des coques disposés par paires (diplocoques) et en chaîne (streptodiplocoques), ce sont des lactocoques qui représente 65.71% de la collection ou streptocoques qui représente 20% de la collection.

Toutes les souches isolées (35souches) sont de couleur bleu-violet.



forme bâtonnet



forme cocci

Figure 5: Examen microscopique des bactéries lactiques.

### II.1.3. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats de tableau (7) révèlent le suivant :

-Les trente – cinq souches sont à catalase négative (pas d'apparition des bulles d'air).

-Toutefois, la recherche du réductase a révélé que treize souches sont capable de réduire et de coaguler le lait tournesolé au même temps, treize autres sont capable de réduire le lait sans coagulation, mais le reste des souches de la collection sont incapable de réduire et de coaguler le lait tournesolé.

-Le test de croissance à différentes températures montre que l'ensemble des souches sont capables de croître à 45°C, mais donnent aussi une croissance à 20°C.

A l'exception de la souche *Lb. fermentum* isolé du raïb qui a poussé à 20°C et non pas à 45°C.

-Vingt-cinq souches ont données un résultat positif sur le lait de SHERMAN à 0,1% de bleu de méthylène. C'est à dire, il y a eu réduction de bleu de méthylène avec coagulation du lait.

-Deux souches *St. thermophilus* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides* ont donné des réactions douteuses sur le lait de SHERMAN à 0,3% de bleu de méthylène c'est à dire , il y a eu réduction de bleu de méthylène sans coagulation du lait.

-avec le bouillon hypersalé, on a éliminé les streptocoques fécaux qui ont donné un résultat positif avec 6,5 % de NaCl, le reste des souches sont des lactocoques ou des streptocoques lactiques.

-D'après les résultats du test ADH, on a remarqué que treize souches donnent des résultats positifs c'est à dire, capables de dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac (couleur violet), trois souches (*St. thermophilus*, *Lc. raffiniosens* et *Lc. lactis* ssp *cremoris*) donnent des résultats intermédiaire (plus au moins), le reste donnent des résultats négatifs (couleur jaune).

-Quant à l'utilisation du citrate, il apparaît que deux souches (*St. thermophilus* et *Lc. lactis* ssp *cremoris*) sont capable de dégrader le citrate et les utiliser comme seule source de carbone, en revanche le reste des souches sont incapable de le faire.

-Pour le test sur le milieu CLARC et LUBS, le résultat était positif chez trois souches dont deux 2 de *St. thermophilus* et une *Lc. lactis* ssp *diacetyllactis* (la présence d'un anneau rouge), des résultats intermédiaires chez sept souches et le reste donnent des résultats négatifs (absence de l'anneau rouge).

-Sur le milieu GIBSON ABD-EL-MALEK, il y a un déplacement du bouchon de la gélose chez deux souches (*Lb. fermentum* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*) et production de gaz. Donc, les souches sont homofermentaires facultatifs ou hétérofermentaire.

Pour le reste de la collection, il n'y a aucun déplacement du bouchon de la gélose, donc ce sont des homofermentaires.

-Enfin le résultat du test d'hémolyse montre que vingt-six souches sont gamma-hémolytiques (hémolyse de type  $\gamma$ ) c'est à dire le milieu de culture n'est pas modifier, neuf souches sont alpha-hémolytiques (hémolyse de type  $\alpha$ );

Les colonies deviennent verdâtre ce qui résulte de la production de peroxyde d'hydrogène par ces bactéries.

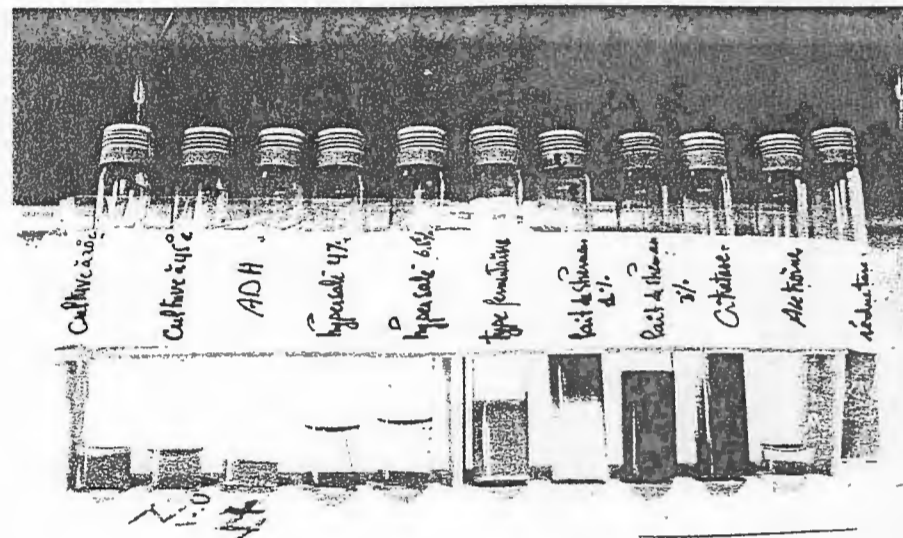


Figure 6 : Profils des tests biochimiques

La souche E<sub>4</sub> *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*

#### II.1.4. Identification par profil de fermentation des sucres et logiciel :

Les profils fermentaires obtenus résumés dans le tableau 8 sont traités par un logiciel API LAB au niveau du laboratoire de biologie moléculaire et génétique de l'université ES-SENIA-ORAN, qui a confirmé les résultats en donnant le nom de l'espèce bactérienne correspondante à chaque profil fermentaire tableau 9 .

L'aspect des souches bactériennes révèle la dominance de la forme sphérique représentée par le genre *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc* dont elle présente

85,71 % du total, le reste (14,29%) est représenté par la forme bâtonnet qui regroupe le genre *Lactobacillus*.

Pour le beurre la dominance des souches *Lactococcus lactis* ssp *lactis* qui représente 46,15% du total de la collection de beurre. *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* est classé en deuxième ordre avec un pourcentage de 30,76%, en troisième ordre *Streptococcus thermophilus* qui représente 15,38%. Enfin, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* avec un pourcentage de 7,69% du total de la collection.

En ce qui concerne le raïb, les souches sont représentées par le même pourcentage 20% et qui regroupe *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*.

Par ailleurs, les souches isolées de l'ensilage sont représentées par *Lc. lactis* ssp *cremoris* avec un pourcentage de 35,29 %. *St. thermophilus* avec un pourcentage de 29,41 %, *Lc. lactis* ssp *lactis* avec les pourcentages de 17,64 %. *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*, *Lc. raffinolactis* et *Lb. lactis* ssp *diacetylactis* avec le même pourcentage 5,88 % du total de la collection isolée de l'ensilage.

En général la souche la plus dominante est *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* avec un pourcentage de 28,57 % du total de la collection étudiée.

L'étude comparative des profils fermentaire des sucres montre que les bactéries lactiques appartenant à la même espèce peuvent présenter des profils fermentaires différents, cette différence est beaucoup plus importante chez l'espèce *Lc. lactis* ssp *cremoris* qui présente des biotypes, le premier biotype B11 est capable de fermenter le mannitol, alors que l'autre B12 ne peut pas le faire donc on dit que ces deux souches sont des biotypes ceci pourrait être due soit à la présence de facteurs transférables comme les plasmides, soit à des mutations.[9]

Il y a aussi deux biotypes de *Lc. lactis* ssp *lactis* B1 et B2, B1 capable de fermenter le maltose et lévulose alors que B2 ne peut pas les faire. Une autre différence entre B1 et B5 mais avec une différenciation dans la fermentation de glucose B1 fermente le glucose mais B5 incapable de le fermenter.

Il y a aussi une différence entre B1 et B6, B1 fermente le lévulose alors que B6 ne le fermente pas. Pour B1 et E9, ce dernier est capable de fermenter la dextrine et le mannose, alors que B1 ne peut pas le faire. Ces résultats, confirment la présence d'une biotypie.

Pour le *Streptococcus thermophilus*, (B3 et B8) les deux biotypes sont différents par la fermentation du lévulose et mannitol, ainsi B8 est capable de les fermenter alors que B3 ne peut pas le faire.

Après avoir comparé les résultats obtenus par logiciel API LAB, les noms des espèces sont résumées dans le tableau suivant :

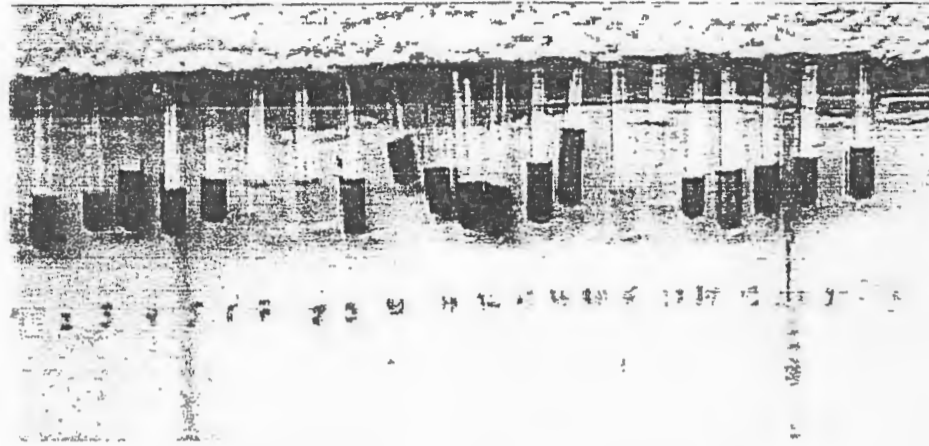


Figure 7: Profil fermentaire des sucres de l'espèce *Lb. fermentum*



Figure 8: profil fermentaire des sucres de l'espèce *Lc. lactis ssp lactis*

TABLEAU 9 : Les noms des espèces identifiés

Nom d'espèce	code
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B1
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	B3
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B4
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B5
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B6
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	B7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	B8
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	B9
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	B10
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	B11
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	B12
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	B13
<i>Lactobacillus fermentum</i>	R1
<i>Lactobacillus curvatus</i>	R2
<i>Lactobacillus helveticus</i>	R3
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	R4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	R5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E1
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E3
<i>Leuco nostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i>	E4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E6
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	E7
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	E8
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	E9
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E10
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	E11
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E12
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	E13
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E14
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E15
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E16
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	E17

## II.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :

### II.2.1. Pouvoir acidifiant :

Les tableaux N°12 et N°13 représentent les résultats de la production d'acide lactique par les souches de bactéries lactiques.

D'après les figures N° 8 et N°9, il apparaît clairement qu'il y a une hétérogénéité dans la production de l'acide lactique au sein des souches et en fonction de niches d'isolement.

En ce qui concerne les souches isolées du beurre, on note que l'espèce *St. thermophilus* possède une forte activité acidifiante avec une quantité de 16,5 g d'acide lactique par litre de lait. L'espèce *Lc. Lactis* ssp *cremoris* produit une quantité de 13 g d'acide lactique par litre de lait et l'espèce qui possède la plus faible activité (7,8g/L d'acide lactique) est *Lc. Lactis* ssp *Lactis* après 24h d'incubation.

Pour les souches isolées de l'ensilage, on remarque que la quantité d'acide lactique produit par les souches est compris entre 14,4g/l et 8,5g/l d'acide lactique, après 24h d'incubation, dont le maximum d'acide lactique est produit par l'espèce *Lc. Lactis* ssp *cremoris*, qui est 14,4g/l de même, l'espèce *Lc. Lactis* ssp *diacetylactis*, possède une activité acidifiante intéressante car, elle donne 11g d'acide lactique par litre du lait. Mais, il apparaît que l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides* est la moins performante, elle produit 8,5g d'acide lactique par litre, après 24h d'incubation.

Par ailleurs, les espèces isolées du raïb produisent des quantité d'acide lactique compris entre (13,7g/l et 8,5g/l) dont l'espèce qui possède une forte activité acidifiante est *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*, l'espèce qui produit une quantité moyenne 11,5g/l après 24h d'incubation est *Lb. curvatus* et *Lb. neiveticus*. L'espèce qui possède la plus faible activité est *Lb. fermentum* avec une quantité de 8,5g/l.

Il existe une relation étroite entre le pH et le degré d'acidité, le pH diminue à mesure que la quantité d'acide lactique produite augmente.



TABLEAU 10 : Pouvoir acidifiant de quelques souches isolées de beurre et du Raib

	0h		2h		4h		6h		8h		24h	
	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D
1	6,60	28	6,51	31	6,50	32	6,47	32	6,41	34	4,44	78
2	6,57	30	6,52	31	6,51	33	6,46	33	6,43	33	4,60	164
3	6,56	27	6,55	30	6,54	31	6,52	33	6,36	36	4,52	165
4	6,58	30	6,56	30	6,50	31	6,48	32	6,32	34	4,51	94
5	6,70	30	6,54	31	6,53	31	6,49	32	6,48	32	4,56	89
6	6,58	30	6,51	31	6,50	31	6,42	33	6,34	33	4,44	86
7	6,58	30	6,52	30	6,50	32	6,41	34	6,31	36	4,53	126
8	6,63	27	6,49	30	6,49	32	6,42	35	6,32	35	4,33	115
9	6,57	30	6,70	30	6,56	31	6,45	32	6,36	37	4,34	115
10	6,59	30	6,56	31	6,47	33	6,38	34	6,31	34	4,53	121
11	6,69	30	6,48	30	6,46	31	6,43	31	6,35	32	4,35	130
12	6,58	27	6,40	32	6,38	33	6,34	34	6,28	37	4,33	100
13	6,66	23	6,48	28	6,45	30	6,31	32	6,28	36	4,53	90
14	6,61	27	6,61	30	6,58	32	6,44	34	6,28	35	4,47	85
15	6,60	30	6,54	31	6,53	31	6,48	33	6,28	37	4,35	115
16	6,68	30	6,52	30	6,48	31	6,40	35	6,25	37	4,34	115
17	6,50	27	6,51	27	6,50	31	6,29	34	5,63	54	4,24	137
18	6,64	30	6,57	30	6,55	31	6,43	31	6,28	35	4,47	130

°D : Degré dornic  
H: Heure  
M : Moyenne.

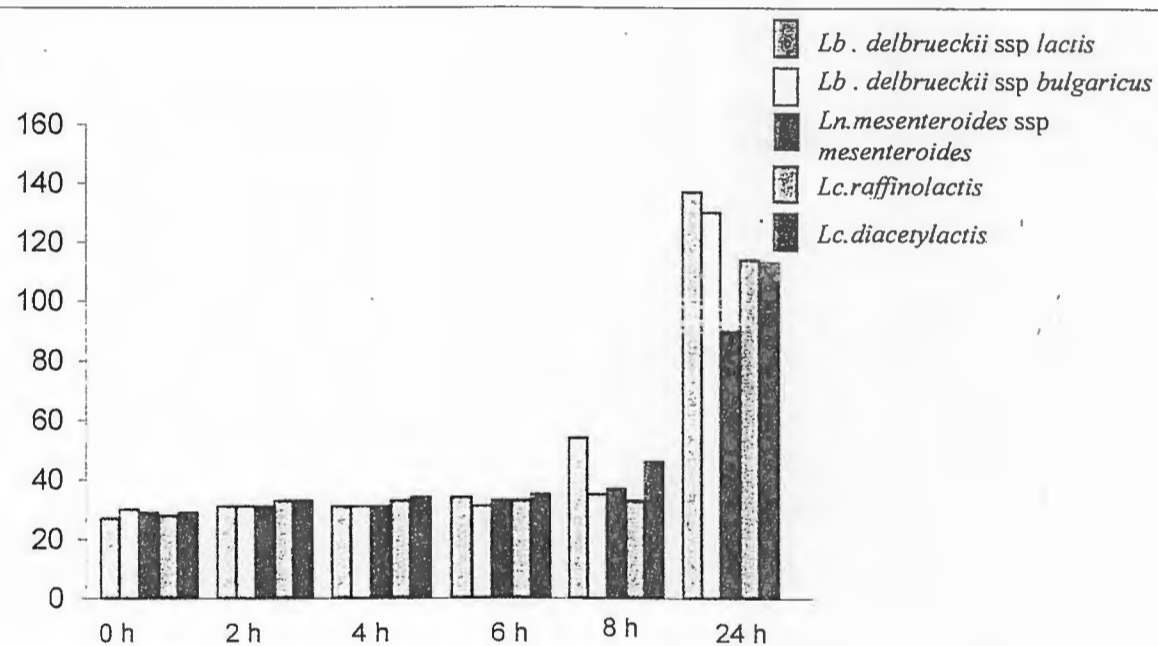


Figure 9 : pouvoir acidifiant de quelques souches identifiées.

TABLEAU 11 : Pouvoir acidifiant de quelques souches isolées de l'ensilage.

	0h		2h		4h		6h		8h		24h	
	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D
19	6,70	30	6,55	31	6,53	32	6,33	33	6,27	37	4,38	130
20	6,57	28	6,49	32	6,43	33	6,41	34	6,38	36	4,53	90
21	6,60	31	6,46	31	6,45	31	6,39	35	6,34	36	4,33	95
22	6,56	29	6,53	31	6,44	31	6,33	33	6,27	37	4,52	90
23	6,67	23	6,51	32	6,48	32	6,42	34	6,39	38	4,31	116
24	6,70	29	6,54	32	6,56	33	6,48	34	6,46	34	4,40	117
25	6,58	28	6,09	33	5,95	33	5,92	33	5,90	33	4,40	114
26	6,40	39	6,38	42	6,30	49	5,71	54	5,62	64	4,95	95
27	6,66	29	6,54	31	6,50	32	6,45	35	6,37	36	4,36	97
28	6,66	30	6,50	31	6,45	34	6,42	35	6,40	37	4,36	108
29	6,57	29	6,52	33	6,33	34	6,21	35	6,05	46	4,36	113
30	6,55	32	6,50	33	6,40	35	5,95	47	6,56	61	4,45	93
31	6,66	34	6,64	46	6,49	55	5,05	76	4,70	97	4,61	100
32	6,70	34	6,50	31	6,47	38	6,42	40	6,40	43	4,59	144
34	6,56	31	6,50	42	6,40	43	5,95	62	5,10	74	4,46	85
35	6,56	31	6,52	31	6,47	32	6,43	33	6,40	34	4,65	110

°D : Degré dornic  
 H : Heure  
 M : Moyenne.

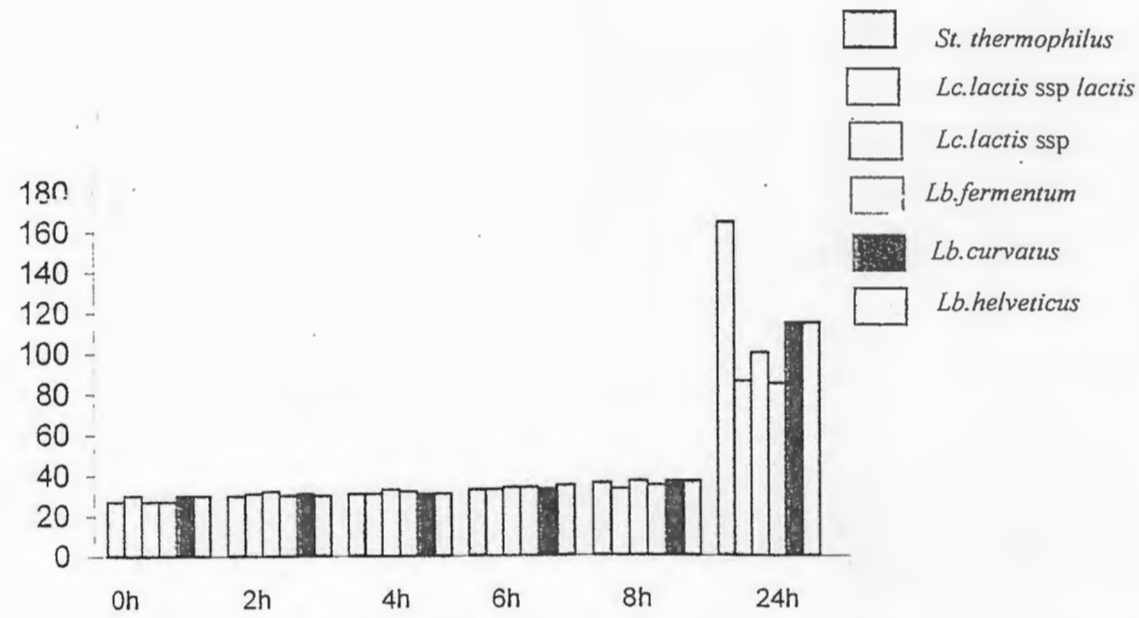


Figure 10 : pouvoir acidifiant de quelques souches identifiées.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les espèces isolées du beurre possèdent une performance acidifiante intéressante pour la fabrication des produits laitiers notamment les fromages et les boissons lactofermentés

Les lactobacilles isolés du raïb, interviennent dans la préparation des produits végétaux fermentés à base de fruit ou légumes salés (olives concombres). [17]

On note que les espèces de genre *Lactobacillus* sont moins performantes que les autres genres de la collection, cela est probablement lié à l'absence de gène ou la présence de gène cryptique. [9]

Enfin, il apparaît que la majorité des souches coagulent le lait en un temps économique moins de 24 h. Ces souches sont dites « Fast Acid Producer » [9].

### III-2-2 ACTIVITÉ PROTEOLYTIQUE :

Les résultats de l'hydrolyse des protéines par les souches lactiques sur le milieu Y.M.A, sont représentés dans le tableau 12.

La figure 11 fournit deux types de réponse, une croissance sans protéolyse et une croissance avec protéolyse.

Les résultats ont montré que vingt-quatre souches de la collection présentent une croissance sans protéolyse c'est-à-dire 68,56 % dont la répartition est comme suite :

Sept souches isolées de beurre cela correspond à 20 %, quatre souches isolées du raïb c'est-à-dire 11,42 % et treize souches isolées de l'ensilage représenté par 37,14 % du total des souches.

Cette inaptitude à hydrolyser les protéines chez les souches testées est probablement liée à la perte ou l'absence du gène ou plasmide codant pour cette activité car les propriétés technologiques des bactéries lactiques sont portées par les plasmides. [9]

Par ailleurs le reste de la collection lactique a montré une croissance avec protéolyse. Il y a une faible activité protéolytique chez six souches isolées du beurre dont le diamètre du zone de protéolyse est compris entre 5mm et 8mm. Exemple *Lc. lactis* ssp *lactis* et *St. thermophilus*

Dans le cas de raïb, il n'y a aucune souche à faible pouvoir protéolytique, elle disposent de complexe protéolytique très actif, la même observation a été notée à l'égard de deux souches de l'ensilage c'est le cas de *St. thermophilus* et *Lc. lactis* ssp *cremoris*

Toutefois, certaines souches ont présenté une forte activité protéolytique avec un diamètre de lyse compris entre 15 mm - 20 mm , on cite comme exemple la souche *Lb. curvatus* ,du raïb, et la souche *St. thermophilus* de l'ensilage .

La présence de zone de lyse indique la présence du gène ou plasmide codant pour cette activité [9].

Enfin, les résultats obtenus autorisent à dire que 31 ,42 % des souches possèdent une activité protéolytique qui est l'une des critères de sélection de cultures destinées à la production de fromage et des autres produits lactofermentés.

La protéolyse due aux bactéries lactiques sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes [8].

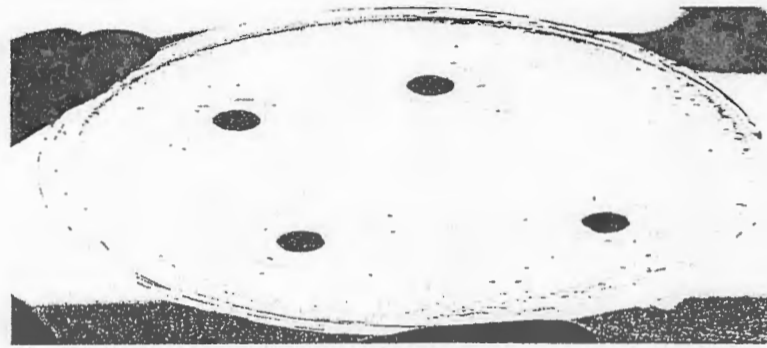


Figure11 : Aptitude protéolytique des bactéries lactiques.

TABLEAU 12: activité protéolytique des bactéries lactiques purifiées.

ESPECES	CODE	DIAMETRE (mm)	EVOLUTION DU TEST	OBSERVATION
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	1	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	2	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	3	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	4	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	5	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	6	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	7	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	8	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	9	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	10	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	11	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	12	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	13	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lb. fermentum</i>	1	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lb. curvatus.</i>	2	15	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lb. Helveticus</i>	3	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	4	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	5	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	1	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	2	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	3	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Ls. mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i>	4	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	5	20	+	Croissance avec protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	6	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc. raffinolactis</i>	7	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	8	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	9	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>St.thermophilus</i>	10	11	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	11	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	12	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	13	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	14	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	15	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	16	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	17	00	-	Croissance sans protéolyse

### III.2.3. PRODUCTION DE POLY SACCHARIDES :

Le tableau 13 montre les résultats de la production de poly saccharides par les bactériés lactiques.

La figure 12 illustre la production des polysaccharides par certaines souches de bactéries lactiques.

Au vu de ces résultats, les souches isolées du beurre et du raïb sont incapable de produire les polysaccharides, ces résultats sont probablement due aux pertes de plasmide, sauf la souche *Lb. curvatus* qui est capable de donner des colonies larges et gluantes sur la gélose hypersaccharosée.

Deux souches isolées de l'ensilage *St. thermophilus* et *Lc. lactis* ssp *lactis* donnent des colonies larges et gluantes sur le milieu hypersaccharosé. Donc il apparaît que 8,56 % de la collection est apte à produire un épaississant.

La formation de polysaccharides épaississantes le lait à été rapportée à la présence de plasmide [8]. Par ailleurs, la fabrication des yaourt, on constate, que l'onctuosité du produit peut être améliorer en utilisant les souches qui augmentent la viscosité du produit en améliorant sa texture. [14]

Certaines bactéries lactiques, notamment les *Lactobacillus* sont responsables de la formation de films muqueux, en surface des produits carnés, conservés sous vide ou des produits de salaisons (jambo). Deux souches de Lactocoques (*Lc. lactis* ssp *cremoris* et *St. thermophilus* produisent de grandes quantités de polysaccharides dans le lait, elles sont impliqués dans la fabrication des produits laitiers traditionnels. [10]

Enfin, l'aptitude texturant des bactéries lactiques est l'un des facteurs les plus importants en industrie fromagère par l'apport des propriétés technologiques recherchés. [9]

D'après, tous ce qui a été rapporte, on déduit qu'on a isolé des souches performantes vis-à-vis de la production de polyosides.



Figure12 : production des poly saccharides par les souches identifiées.

TABLEAU 13 : Production de polysaccharides par les bactéries lactiques identifiées.

ESPECES	CODE	EVALUATION DU TEST	OBSERVATION
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	1	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	2	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	3	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	4	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	5	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	6	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	7	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	8	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	9	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	10	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	11	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	12	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	13	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb. fermentum</i>	1	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb. curvatus</i>	2	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb. Helveticus</i>	3	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	4	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	5	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	1	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	2	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>St. thermophilus</i>	3	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>mesenteroides</i> ssp <i>Ls.</i> <i>mesenteroides</i>	4	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	5	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	6	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc. raffinolactis</i>	7	-	Croissance sans production de polysaccharides

<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	8	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	9	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>St. thermophilus</i>	10	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	11	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	12	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i>	13	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	14	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	15	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	16	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc.lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	17	-	Croissance sans production de polysaccharides



### II.3. Interactions bactériennes :

Le tableau 14 et 15 représente les résultats obtenus concernant les interactions entre les différentes souches des bactéries lactiques.

Ce test va mettre en évidence les caractéristiques qu'elles possèdent, certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches une fois mis en contact. La lecture de nos résultats, nous a permis de dégager le suivant :

➤ Une symbiose entre deux souches, c'est le cas de *Lc. lactis* ssp *Lactis* et *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*, *Lc. raffinolactis* et *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* et *St. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*

Une 1<sup>ère</sup> souche ensemencé en masse *Lc. lactis* ssp *lactis* vive en symbiose avec une autre souche imbibé sur disque *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*, le même résultat est obtenu dans le cas inverse *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* ensemencé en masse, *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* imbibé sur disque.

➤ Un hétéro-antagonisme quand il y a inhibition entre couples de souches d'espèces différents c'est le cas de *Lb. fermentum* et *Lc. lactis* ssp *lactis*,

*Lb. curvatus* et *Lc. lactis* ssp *lactis*, *Lb. helveticus* et *Lc. lactis* ssp *lactis* une souche ensemencé en masse *Lb. curvatus* peut inhiber la souche *Lc. lactis* ssp *lactis* imbibé sur disque et le même résultat dans le cas inverse, où la souche *Lb. curvatus* imbibé sur disque inhibe la souche *Lc. lactis* ssp *lactis* ensemencé en masse.

Par ailleurs, nous avons observé deux types de réponse :

➤ Une souche ensemencée en masse, peut inhiber la croissance d'une autre souche d'espèce différente imbibé sur disque mais dans le croisement inverse aucune inhibition n'est marquée c'est le cas de *Lc. raffinolactis* ensemencé en masse qui n'inhibe pas la croissance de *Lb. fermentum* imbibé sur disque, alors que dans le croisement inverse, il y a présence d'inhibition, de même pour les couples

*Lb. fermentum* et *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum* et *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum* et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*.

➤ Le second type de réponse est celui où la souche sur disque inhibe les souches en masse. Ce cas est observé chez la souche *Lc. lactis* ssp *diacetylactis* qui inhibe toutes les autres souches lorsqu'elle est ensemencé en masse, dans le cas inverse c'est à dire imbibé sur disque elle inhibe que *Lb. fermentum*, *Lb. curvatus* et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Ces inhibitions s'expliquent par la synthèse de substances telles que les antibiotiques et les bactériocines, ces dernières en été mises en évidence chez

la plupart des bactéries lactiques, aussi bien chez les lactocoques que chez les lactobacilles et chez les pediococques [9].

Les bactériocines sont synthétisées par un très grand nombre de souches des bactéries lactiques, ils sont généralement thermorésistants, actif uniquement sur les bactéries à Gram positif.

Enfin, nous pourrions à partir de ces résultats constituer des levains mixtes, qui seront utiles pour la continuité de cette étude. [17]

## II.4. Reconstitution de levains lactiques :

### II.4.1. Pouvoir acidifiant :

A partir des résultats obtenus et répertoriés sur le tableau 6 (Figure : 12), il apparaît clairement que les levains reconstitués ont un pouvoir acidifiant moins performant que les souches pures, ils produisent entre 3 et 11,3g/l d'acide lactique après 24h d'incubation.

Par ailleurs, les résultats montrent que le levain formé des deux souches

*Lc. raffinolactis* et *Lb. curvatus* est le plus performant car il produit jusqu'à 11,3g/l d'acide lactique, la quantité moyenne est produite par le levain formé de *Lc. Lactis* ssp *lactis* et *Lb. helveticus* et la plus faible conversion de lactose en acide lactique est enregistré avec le levain composé de *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* et *St. thermophilus*, estimé à 9,1 g d'acide lactique par litre de culture après 24h d'incubation

Toute fois, l'obtention de coagulation du lait après 12h d'incubation témoigne que nos levains sont acidifiants.

Les ferments acidifiants sont utilisés dans la fabrication des pattes non cuites, ces dernières sont formées de *St. lactis* et *St. cremoris*.

*Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* et *St. thermophilus* sont utilisés dans la fabrication de yaourt [17].

Pour la fabrication de fromages à pattes pressés, cuites (gruyère et emmenthal). on ajoute *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*, *Lb. helveticus* et *St. thermophilus* [17]

Alors que pour la fabrication de fromage frais ou à patte molle on utilise les espèces suivantes :

<i>Lc. Lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	} formation du caillé	[17]
<i>Lc. Lactis</i> ssp <i>lactis</i>		
<i>Lc. lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>		

TABLEAU 14 : Les interactions entre des bactéries lactiques.

SM SD	<i>Lc. Lactis</i> ssp <i>lactis</i>	<i>Lc. Lactis</i> ssp <i>lactis</i>	<i>Lc. raffinolactis</i>	<i>St. thermophilus</i>	<i>Lc. Lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>
<i>Lb. Fermentum</i>	-	+	-	+	+
<i>Lb. Curvatus</i>	-	+	-	+	+
<i>Lb. Helveticus</i>	-	+	-	+	+
<i>Lb. Delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	-	+	-	-	+
<i>Lb. Delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	-	+	-	-	+

SM: souches ensemercer en masse.

SD : souches imbibé sur disque.

+ : test positif.

- : test négatif

TABLEAU N° 13 : Les interactions inverse

SD \ SM	<i>Lb. Fermentum</i>	<i>Lb. Curvatus</i>	<i>Lb. Helveticus</i>	<i>Lb. Delbrueckii ssp lactis</i>	<i>Lb. Delbrueckii ssp bulgaricus</i>
<i>Lc. Lactis ssp lactis</i>	+	+	+	-	+
<i>Lc. Lactis ssp lactis</i>	+	+	+	-	+
<i>Lc. raffinolactis</i>	+	+	+	-	+
<i>St. thermophilus</i>	+	+	-	-	+
<i>Lc. Lactis ssp diacetylactis</i>	+	+	-	-	+

SM: souches ensemercer en masse.

SD : souches imbibé sur disque.

+ : test positif.

- : test négatif.

L'espèce *Lc. Lactis* peut être utilisé avec *Leuconostoc* pour la fabrication de kéfir et koumis

Enfin, nos ferments mixtes peuvent être exploités dans les procédés de transformation et de conservation des produits alimentaires, ils ont un intérêt technologique certain.

**TABLEAU 16 : Pouvoir acidifiant des levains mixtes des bactéries lactiques**

	0h		2h		4h		6h		8h		24h	
	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D	pH(M)	°D
1	6,58	31	6,56	33	6,54	36	6,53	37	6,45	44	4,26	109
2	6,56	31	6,56	33	6,45	37	6,50	39	6,40	43	4,33	105
3	6,56	31	6,56	33	6,54	36	6,53	37	6,37	42	4,36	102
4	6,57	31	6,55	33	6,54	36	6,53	37	6,53	40	4,36	109
5	6,57	31	6,55	33	6,54	35	6,53	37	6,46	40	4,44	101
6	6,57	31	6,54	34	6,53	36	6,52	39	6,52	39	4,17	112
7	6,57	31	6,54	33	6,53	36	6,53	38	6,50	39	4,20	<u>113</u>
8	6,59	31	6,55	33	6,53	36	6,53	38	6,52	39	4,37	100
9	6,57	31	6,51	36	6,50	39	6,50	40	6,49	46	4,48	97
10	6,58	31	6,52	37	6,51	40	6,51	41	6,49	42	4,47	91
11	6,56	32	6,52	36	6,51	39	6,51	42	6,50	43	4,67	108
12	6,54	32	6,52	36	6,52	37	6,51	45	6,55	46	4,38	93
13	6,54	33	6,52	37	6,51	39	6,50	45	6,53	46	4,63	105
14	6,50	32	6,50	37	6,53	40	6,51	46	6,53	47	4,49	94
15	6,56	33	6,50	37	6,50	39	6,50	46	6,55	47	4,36	101

°D : Degré dornic

h : heure

M : Moyenne.

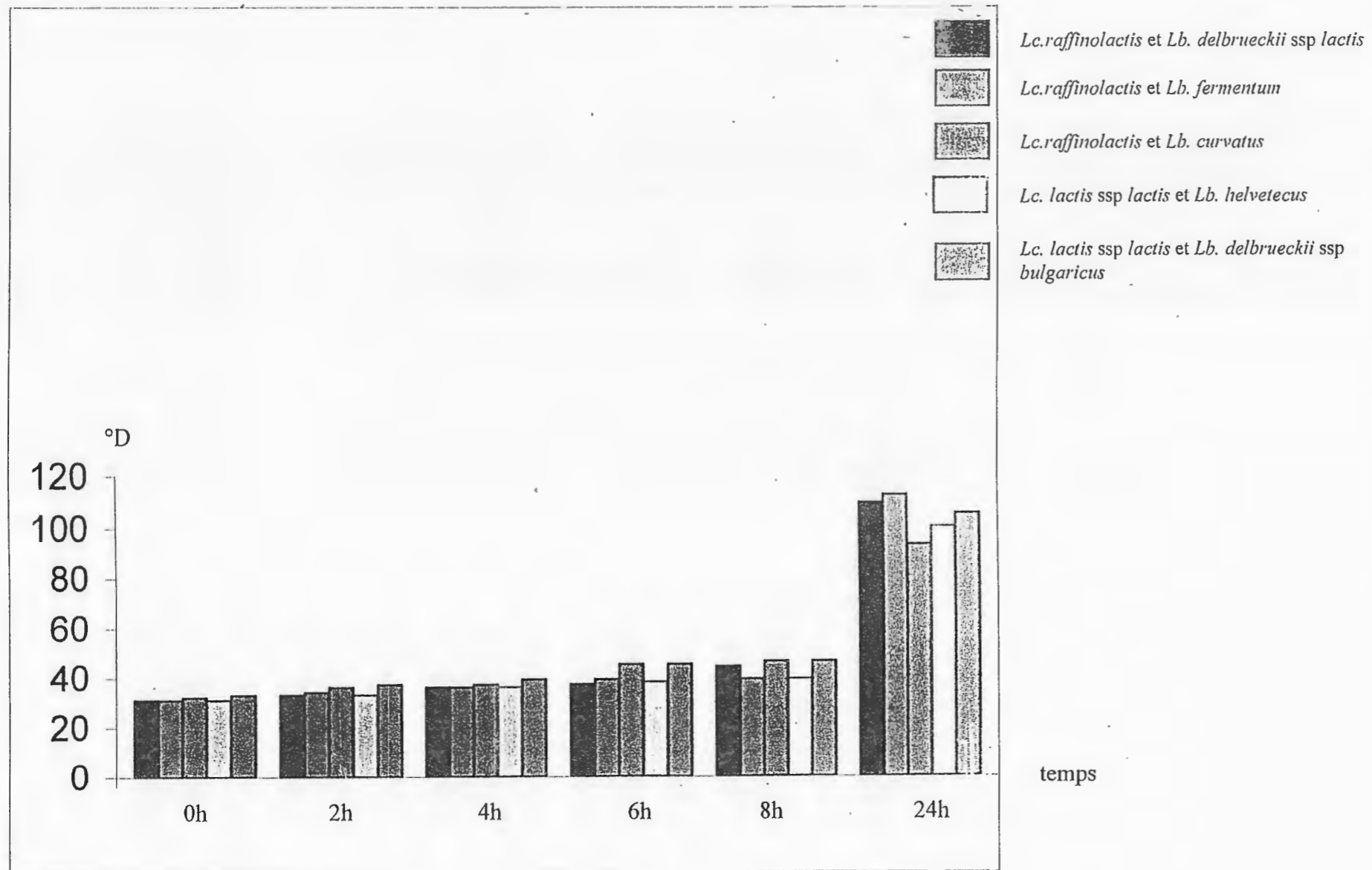


Figure 13 : Pouvoir acidifiant de quelques levains mixtes

#### II.4.2. Pouvoir protéolytique :

Les résultats sont représentés dans le tableau 17.

D'après les résultats obtenus, on constate que neuf levains représentent une croissance sans protéolyse, ils sont dépourvus d'une activité protéolytique, donc ce milieu fournit les facteurs de croissance aux levains et ces derniers sont incapables d'hydrolyser les protéines présentes dans le milieu. Le reste des levains en nombre de six possèdent une activité protéolytique faible, ils donnent un diamètre de zone de protéolyse compris entre 5 et 9 mm. la meilleure protéolyse est obtenue avec le levain formé de

*Lc. raffinolactis* et *Lb. curvatus* avec un diamètre de lyse protéique de 9mm, le plus faible ferment donne une zone de 7 mm *Lc. raffinolactis* et *Lb. delbrueckii ssp lactis*.

L'inaptitude des levains à hydrolyser les protéines peut s'expliquer par la perte ou l'absence de gène ou plasmide codants pour cette activité. [9]

La protéolyse due aux bactéries lactiques sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes [8].

On ce fait les six levains dotés d'une activité protéolytique peuvent être un support pour de nombreux produits alimentaires.

#### II.4.3. Production de polysaccharides :

Les résultats sont représentés dans le tableau 18

La figure 14 illustre la production de polysaccharides par un levain mixte formé de *Lb. delbrueckii ssp lactis* et *Lc. raffinolactis*.

Au vu de ces résultats, les huit levains présentent une croissance avec des colonies larges et gluantes et sont donc identifiés productrices de polysaccharides.

Le reste des levains donne une croissance sur le milieu hypersaccharosé, mais avec des colonies bactériennes de formes régulières.

Pour la fabrication de yaourts brassés, on constate que l'onctuosité du produit pourrait être améliorée en utilisant des souches particulières, produisant un épaissement du lait supérieur à celui obtenu par la simple prise en gel du lait sous l'effet de l'acidification [2].

Par ailleurs les ferments épaisseurs sont intéressants car ils augmentent la viscosité et l'onctuosité du produit, en améliorant sa texture, ils évitent ainsi, au cours de stockage, qu'une séparation du sérum et des caséines coagulées ne se produise. [5] Ces données bibliographiques témoignent l'intérêt que possèdent nos ferments mixtes.

TABLEAU 17 : Activité protéolytique des levains mixtes des bactéries lactiques.

ESPECES	CODE	DIAMETRE (mm)	EVALUATION DU TEST	OBSERVATION
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	1	7	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lb.delbrueckii</i> + <i>Lc.lactis ssp diacetylactis</i>	(2)	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	(3)	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb. fermentum</i>	(4)	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> +	(5)	9	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. fermentum</i>	(6)	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(7)	<u>9</u>	+	Croissance avec protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb. helveticus</i>	(8)	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	(9)	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> + <i>St. thermophilus</i>	(10)	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> + <i>L c.lactis ssp lactis</i>	(11)	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(12)	00	-	Croissance sans protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i>	(13)	8	+	Croissance avec protéolyse
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(14)	9	+	Croissance avec protéolyse
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i>	(15)	00	-	Croissance sans protéolyse



**TABLEAU 18 : Production de polysaccharides par les levains mixtes des bactéries lactiques**

ESPECES	CODE	EVALUATION DU TEST	OBSERVATION
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	(1)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>Lb.delbrueckii</i> + <i>Lc.lactis ssp diacetylactis</i>	(2)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	(3)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>L c.lactis ssp lactis Lb.delbrueckii ssp lactis</i> +	(4)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>L c.lactis ssp lactis Lb.delbrueckii ssp lactis</i> +	(5)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. fermentum</i>	(6)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(7)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb. helveticus</i>	(8)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i>	(9)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> + <i>St. thermophilus</i>	(10)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> + <i>L c.lactis ssp lactis</i>	(11)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(12)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i>	(13)	-	Croissance sans production de polysaccharides
<i>L c.lactis ssp lactis</i> + <i>Lb. curvatus</i>	(14)	+	Croissance des colonies larges et gluantes
<i>Lc. Raffinolactis</i> + <i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i>	(15)	-	Croissance sans production de polysaccharides

**LEVAINS MIXTES DES BACTERIES LACTIQUES**



Figure 14 : Production de polysaccharides des levains mixtes

## CONCLUSION GENERALE

La première partie de notre étude axée sur l'isolement et la purification des souches lactiques à partir de trois substrats différents ( beurre traditionnel jijelien, raïb et ensilage ) , leur caractérisation par des tests physiologiques et biochimiques , et leur identification par des profils fermentaires associé à un logiciel API LAB , nous a permis d'obtenir une collection de trente-cinq souches lactiques .

Cette collection renferme 11 espèces appartenant aux quatre genres :

*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

28,57% de la collection représentée par la souche *Lc. lactis* ssp *cremoris*, 25,71% est représentée par *Lc. lactis* ssp *lactis*, 20% est représentée par *St. thermophilus* , 5,71% est représentée par *Lc. lactis* ssp *diacetylactis*, le restant des souches sont représentées par le même pourcentage 2,86%.

L'étude de quelques aptitudes technologiques, à savoir l'aptitude acidifiante, la protéolyse et l'aptitude texturant montre que la majorité de nos souches sont acidifiantes avec un maximum de 16,5 g/l produite par *Streptococcus thermophilus* , par ailleurs la recherche de l'activité protéolytique a montré que les 11 espèces possèdent cette aptitude technologique. trois souches ont la faculté de synthétiser des polysaccharides, ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits laitiers.

Le test des interactions montre une symbiose, antibiose et hétéroantagonisme ce qui explique que nos souches produisent des

substances antibactériennes à savoir les bactériocines qui constituent un moyen de lutte contre les bactéries pathogènes en technologie laitière. Au vu des résultats obtenus, nos souches présentent un grand intérêt pour l'industrie laitière algérienne.

Les levains reconstitués montrent des bons résultats sur le plan technologique, ils sont acidifiants, à activité protéolytique faible, et une très bonne aptitude texturant.

A l'instar des résultats obtenus au cours de notre expérimentation nos souches présentent des intérêts technologiques aussi bien qu'économiques

Donc il s'avère très nécessaire de les introduire en industrie laitière, notamment dans la fabrication des fromages.

Enfin, notre étude devra être complétée par :

- la recherche de l'ADN plasmidique.
- la recherche des phages.

## RESUME :

L'étude relative à l'isolement, purification, caractérisation et identification des souches lactiques à partir de trois substrat ( beurre traditionnel jijelien, raib et ensilage ), nous a permis d'avoir une collection de 35 souches représentées par 11 espèces appartenants aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*, *Leuconostoc*.

L'étude des profils fermentaires montre une hétérogénéité au sein même de l'espèce

Les aptitudes technologiques étudiées montrent que les souches sont pour la majorité très bonnes acidification (*Streptococcus thermophilus* produit 16.5g d'acide lactique /L de lait ) , certaines ont une bonne activité protéolytique et aptent à produire des exopoiysaccharides .

L'étude des interactions bactériennes nous a permis de voir les effets de stimulation et d'inhibition, ainsi la mise en évidence de la production de substances inhibitrices .

L'étude de quelques aptitudes technologiques des levains lactiques reconstitué montre qu' ils ont un bon pouvoir acidifiant et une activité protéolytique faible .

**Mots clés** : bactéries lactiques, aptitudes technologiques, interactions, levains.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

- ① 1- BOURGEOIS ET LARPENT 1996<sup>1<sup>er</sup> édition</sup> Microbiologie Alimentaire TEC et DOC Lavoisier P 76. <sup>2<sup>ème</sup> édition</sup>
- ② 2- BOURGEOIS C.M., LARPENT J. P. 1988 : Microbiologie Alimentaire. , p 302,305.
- ③ 3- C.M. BOURGEOISE, J.Y. LEVEAU 1980 : techniques d'analyse et de contrôle dans les I.A.A. APRIA, TEC ET DOC, Lavoisier.
- 4- DEROISSART H. B., 1986 : Les bactéries lactiques .In.lait et produits laitiers par LUQUET F.M.Ed technique et documentation lavoisier, paris, T3, 343-407.
- 5- DESMAZEAUD M. , 1996 :cahier agriculture .adresse :<http://www.aup.fr/uref-org/revues/agri/5-96/dos3.htm>.
- 6- GUIRAUD.J. JOSEPH, 1998 :Microbiologie Alimentaire collection science et technique agro-alimentaire, paris. P90-92.
- 7- JEREMIJI, L.J. RASIE 1978 : fermented fresh milk producted -volume I.
- 8- J-LENOIR, J.HERMIER, F.WEBER 1992 /les groupes microbiens d'intérêt laitier.
- 9- J-Y. LEVEAU, M.BOUIX , H. DEROISSART 1991 : technique d'analyser et de Contrôle dans les I.A.A. 2<sup>ème</sup> édition. Volume III. TEC ET DOC, Lavoisier.
- 10- HAMAMES N., isolement, identification et caractérisation des bactéries lactiques de lait de vache local. Thèse de magister institut des sciences de la nature université de constantine. 110 p
- 11- HEMME D., FERCHICHI M., DESMAZEAUD M.J. ,1986 : l'avenir des Levains lactiques et des levains non lactiques. Ind.agr Sci .,322p .
- 12- KHANNA et SINGH. , 1979
- 13- LECLERC H., BUTTIAUXR. , GUILAUME J., WATTRE P., 1977 : Microbiologie appliquée .Ed. Doin, institut pasteur de Lille ,180p.
- 14- LEVEAU J. V .,BOUIX M.1993, Microbiologie industrielle. Ed. technique et documentation. Lavoisier, p172-175.
- 15- MARTINET J., MARIECHOUDEBINE., 1993 : biologie de lactation .Ed. ENSERM/ INRA, paris 536p.

16-MEDJOUJ H, 1993 : Identification des bactéries lactiques, essai de détermination du pouvoir acidifiant de quelques souches. Thèse d'ingénieur, institut INTAA université de Constantine, 113 p.

17-SUTRA L., FEDERIGHI M., JOUVE J.L., 1998: manuel de bactériologie alimentaire.  
P 235,236, 240,241 242.

18-VUILLEMARD ? J-C ?1986 microbiologie des aliments volume 3 Tec et Doc.LAVOISIER, .parés, p168

19- [http://www.inraa.com/docs/01254\\_bl/bctr.html](http://www.inraa.com/docs/01254_bl/bctr.html).

## ANNEXÉ

## 1. MILIEUX D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION :

**-MRS (bouillon et gélose) :**

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Acétate de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O	0.05g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Agar (dans le cas de gélose)	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH=6.2

Stérilisation 15mn à 120°C

**-M<sub>17</sub> (bouillon et gélose) :**

milieu complet

-milieu de base préalablement fondu et ramené à 48-50°C

-solution de lactose chauffée à 48°C

mélangé par agitation ,incubation deux (2) jours à 37°C

milieu de base :

Peptone trypsique de caséine	2.5g
Peptone pepsique de viande	2.5g



Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure déshydraté	2.5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium , 7 H <sub>2</sub> O	0.25g
Acide ascorbique	0.5g
Agar (dans le cas de gélose )	8à18g
Eau	950ml

pH =7.1-7.2

Stérilisation 20mn à 120°C

Solution de lactose :

Lactose	10g
Eau	100ml

Stérilisation 20 mn à 120°C

**2. MILEUX D'IDENTIFICATION :**

**-Réductase :**

lait écrémé stérilisé en tube (15%)

teinture de tournesol

autoclavage 10mn à121°C

**-Lait de SHERMAN :**

-9ml de lait écrémé (0%) stérile en tube

1ml de bleu de méthylène à 1%

-7ml de lait écrémé (0%) stérile en tube

3ml de bleu de méthylène à 3%

**-Milieu hypersalé**

gélose	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	15g
NaCl	65g
Eau distillée qsp	1000ml

pH final 7.5

stérilisation 20mn à 120°C

C'est le milieu hypersalé à 6.5% de NaCl.

On change la concentration en NaCl (40g) pour obtenir le milieu hypersalé à 4% de NaCl.

**-Arginine dehydrolase (ADH) :**

le milieu de base est le suivant :

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Pyridoxal	0.005g
Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 2%	5ml
Glucose	0.5g
Eau distillée qsp	1000ml
pH = 6.4	

milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine, la répartition est faite en tubes stériliser 15mn à 120°C.

**-Citrate de SIMMONS :**

Sulfate de magnésium	0.2g
----------------------	------

Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate d'ammonium	0.2g
Phosphate d'ammonium monosodique	0.8g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml
pH= 7	

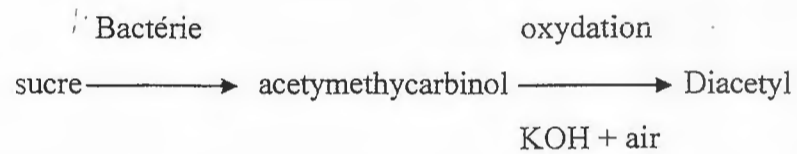
**-Acétoine :**

**-milieu CLARK et LUBS :**

Peptone tryptique	10g
Glucose	10g
Phosphate bipotassique	2g
Eau distillée qsp	1000ml
pH final =6.5	
stérilisation 15mn à 120°C	

**-réactions voges proskauer :**

permettent de distinguer les aromatisants des acidifiants.



Diacetyl + alpha naphтол et un produit de décomposition de l'arginine dans le peptone donne une couleur rouge.

**3. MILIEUX POUR L'ETUDE DES APTITUDES TECHNOLOGIQUE :****- milieu Y M A (Yeast Milk Agar )**

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Lait écrémé	1g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH = 7,1

stérilisation à 120°C pendant 20mn

**-milieu hypersaccharosé :**

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

pH =6.8~7

stérilisation à 120°C pendant 20mn

**Thème :**

**Isolement, purification, caractérisation et identification des bactéries lactiques.**

Nom et prénom des étudiantes :

- ✦ Boutouatou Linda.
- ✦ Miloudi Hanane.
- ✦ Ben aouida Ratiba.

Date de la soutenance :

Le : / 07 / 2004.

**SUMMARY:**

The relative survey to the isolation, purification, characterization and identification of the lactic stumps to pasture of three substratum (butter traditional jizeliu, raif and ensilage), allowed us to have a collection of 35 stumps represented by 11 species apartments in the *Lactococcus* kinds, *Lactobacillus* and *Streptococcus*, *Leuconostoc*.

The survey of the profiles fermentaires shows heterogeneity within the species. The studied technological faculties show that the stumps are for the majority very housemaids acidification (*Streptococcus thermophilus* produces 16.5g of lactic acid / L of milk), some have a good activity proteolytic and capable to produce some exopolysaccharides. The survey of the bacterial interactions allowed us to see the effects of stimulation and inhibition, so the setting in evidence of the production of inhibitory substances. The survey of some technological faculties of the lactic leavens reconstituted watch that they have a good power acidifying and a weak proteolytic activity.

**Key words:** lactic bacteria, technological faculties, interactions, leavens.

**الملخص:**

إن الدراسة المتعلقة بعزل، تنقية، التعرف على خصائص وتعريف البكتيريا اللبنية انطلاقاً من ثلاثة مواد (زبدة تقليدية من أصل جبلي، الرائب والحشيش)، سمحت لنا بالحصول على مجموعة تتكون من 35 سلالة ممثلة بـ 11 نوع تنتمي إلى أجناس *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* و *Lactococcus*.

إن دراسة الخصائص التكنولوجية تبين عدم التجانس داخل النوع الواحد. الخصائص التكنولوجية المدروسة تبين أن أغلبية السلالات المدروسة ذات قدرة كبيرة جداً على إنتاج حمض اللبن (*Streptococcus thermophilus*) التي تنتج 16.5 غرام من حمض اللبن في اللتر الواحد من الحليب، البعض منها لديها فعالية جيدة لتحليل البروتينات وقادرة على إنتاج متعددات السكر.

إن دراسة التفاعل بين البكتيريا اللبنية يسمح لنا بمشاهدة نتائج التحريض والتثبيت، أيضاً تبين بشكل واضح إنتاج المواد المثبطة.

إن دراسة بعض الخصائص التكنولوجية للمخمرات اللبنية التي كونها، تبين أن لها قدرة جيدة على إنتاج حمض اللبن وقدرة ضعيفة في تحليل البروتينات. الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، الخصائص التكنولوجية، التفاعلات، المخمرات.