

Remerciement

On remercie, Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*On tient à remercier notre encadreur **Monsieur RAHMOUNE Y.**, pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire. Depuis les premiers instants, sa pédagogie, son écoute, et son ouverture d'esprit, ont été importants pour nous*

que ses connaissances et ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

*Nos vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail : Nous remercions **Monsieur le professeur Idoui T.** qui a accepté de présider ce jury dont nous lui exprimons notre haute considération. Nos sincères remerciements vont à **Madame Benhamada N.** d'avoir accepté d'examiner ce travail et on lui exprime nos profondes reconnaissances pour son aide précieuse.*

*On voudrait exprimer nos remerciements les plus vifs à **Monsieur Khennouf T., Madame Aitmeddour A. et monsieur Khoudir M.** pour leurs aides techniques, leurs gentillesse et leurs grandes disponibilités et confiance.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à nos camarades de Master Microbiologie. **A tous l'équipe du laboratoire de l'Université de Jijel et de l'Université de Béjaia** à tous ce qui a contribué à l'évolution de cette étude de près ou de loin pour leurs soutien et encouragements.*

Liste des abréviations

ARNr 16 S: Acide ribonucléique ribosomiale de la petite sous-unité 16S.

C: Cytosine.

CO₂: Dioxyde de carbone.

FAO: Food and Agriculture Organization.

G: Guanine.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

H⁺: Ion d'hydrogène.

H₂O: Dioxyde d'hydrogène.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

Lb: *Lactobacillus*.

Lc: *Lactococcus*.

M17 : Milieu de Terzaghi.

MRS: Man Rogosa et Sharpe.

OMS: Organisation mondiale de la santé.

pH: potentiel d'Hydrogène.

PTS :phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant.

S : Souche.

ssp : Sous espèce..

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Sataphylococcus</i> d'après Axcelsson (2004).....	02
Figure 2 : Les principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques.....	03
Figure 3 : Métabolisme du lactose et du glucose : le transport membranaire se fait par le système phosphotransférase (PTS) et P- β -galactosidase (P- β -Gal) ou perméase (Perm) et β -galactosidase (β -Gal).....	09
Figure 4 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.....	10
Figure 5 : Système protéolytique de <i>L. lactis</i>	11
Figure 6 : Principales voies de la lipolyse	12
Figure 7 : Test de mesure du PH.....	18
Figure 9: profil de prédiction du mélange le plus approprié.....	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Les genres des bactéries lactiques utilisés en biotechnologie alimentaires et leurs caractéristiques différentielles.....	07
Tableau 2: Les mélanges des souches lactiques.	17
Tableau 3: L'aspect de colonie sur gélose et le mode de regroupement.....	20
Tableau 4: Résultats de standardisation de l'inoculum.....	21
Tableau 5: Les résultats de l'étude de l'activité acidifiante des bactéries lactiques à 12°C.....	21
Tableau 6: Les résultats de l'étude de l'activité acidifiante des bactéries lactiques à 30°C.....	22
Tableau 7: Les résultats de l'étude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques à 12°C.....	23
Tableau 8: Les résultats de l'étude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques à 30°C.....	24
Tableau 9: Les résultats de l'étude de l'activité lipolytique des bactéries lactiques à 12°C.....	25
Tableau 10: Les résultats de l'étude de l'activité lipolytique des bactéries lactiques à 30°C.....	26
Tableau 11: Plan de mélanges des souches bactériennes et les repenses.....	27

Introduction

Les bactéries lactiques occupent des niches écologiques extrêmement variées, sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.) (**Desmazeaud, 1992**).

Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés. Les peptides et acides aminés libérés sont en effet des précurseurs de nombreuses molécules riches en saveurs et en arômes qui sont à la base du succès gastronomique des fromages (**Pilet et al., 1998**).

L'un des défis le plus important de l'industrie laitière est donc de choisir les espèces et les souches bactériennes les mieux adaptées aux diverses technologies de transformation des laits par fermentation. Pour cela cette étude a été réalisée afin de déterminer les caractéristiques technologiques de quelques souches lactiques et les interactions qui se produisent de leurs mélanges qui présentent un intérêt technologique en se basant sur l'étude de l'activité acidifiante, protéolytique et lipolytique, de ces souches lactiques et leurs mélanges, à différentes températures.

I. Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles ayant un GC% <50%, anaérobies aérotolérants, asporogènes, se présentant sous formes de coques ou de bâtonnets capables de fermenter les sucres en acide lactique (Khodja, 2018; Pot, 2008). Elles sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux (Tailliez, 2001; Ouadghiri, 2009).

Appartiennent au phylum *Firmicutes*, la classe *Bacilli* et à l'ordre *Lactobacillales*, comportant les familles suivantes : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (Ababsa, 2012). Elles sont regroupées en 12 genres dont: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Axelsson, 2004; Khodja, 2018; Pot, 2008) (figure 1).

Les *Bifidobacteriaceae* sont aussi classées parmi les bactéries lactiques car comme bactéries lactiques elles sont reconnues comme GRAS et acidifiant le lait (Axelsson, 2004; Khodja, 2018).

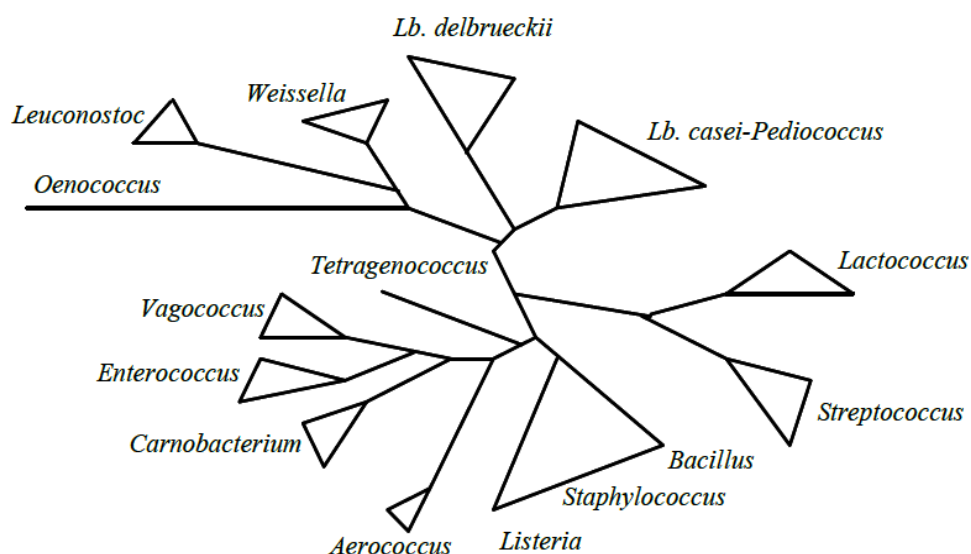


Figure 1: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après Axelsson (2004).

En se basant sur le profil de fermentation de glucose les bactéries lactiques sont classées en trois groupes (figure 2) (Allouche *et al.*, 2010 ; Leveau *et al.*, 1993).

Groupe I : Renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofermentation. Toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre

Lactobacillus) suivent la voie d'Embden-Mayerhof pour dégrader les hexoses en acide lactique; produit majeur la fermentation (Ababsa, 2012 ; Leveau *et al.*, 1993).

Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Ababsa, 2012 ; Leveau *et al.*, 1993).

Groupe II : Inclus les bactéries réalisant l'hétérofermentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Ces bactéries utilisent la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) pour transformer le glucose en CO₂, éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique (Ababsa, 2012 ; Leveau *et al.*, 1993).

Groupe III: Ce groupe présente une position intermédiaire entre les groupes I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofermentation selon les conditions environnementales. Il regroupe quant quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (Allouche *et al.*, 2010 ; Leveau *et al.*, 1993).

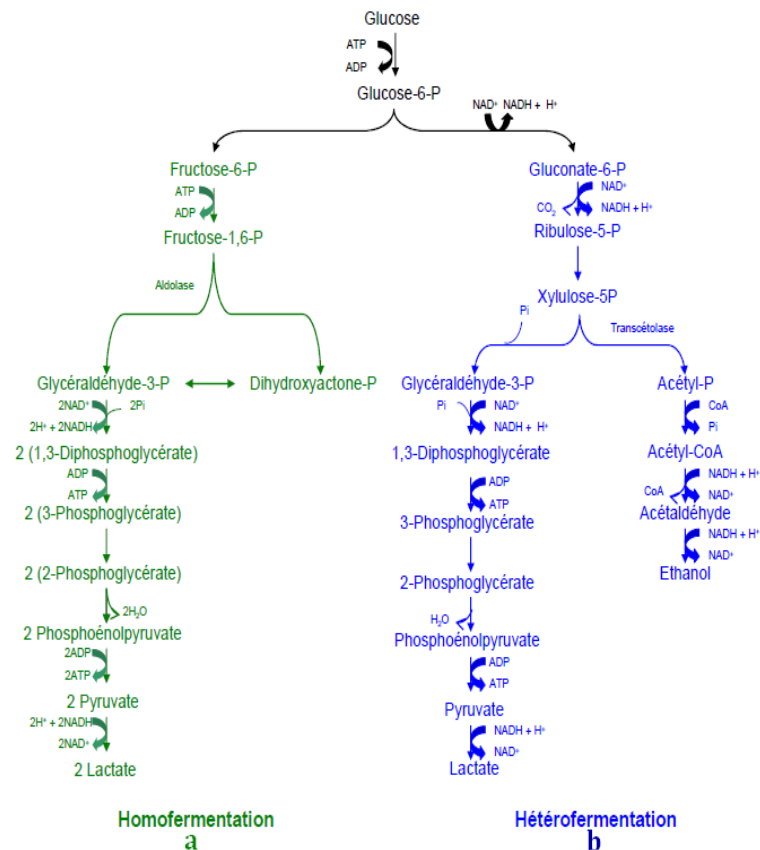


Figure 2 : Les principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques (Allouche *et al.*, 2010 ; Leveau *et al.*, 1993)

II. Utilisations des bactéries lactiques

Elles ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés (**Badis et al., 2005 ; Feutry et al., 2016 ; Rabah, 2010**). Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le milieu et d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant l'altération de la qualité marchande et sanitaire (**Wilson et al., 2005 ; Joubert, 2016**).

1. Activité protéolytique :

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (**Zergoune, 2015**). Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en acides aminés et petits peptides (**Joubert, 2016 ; Maghnia, 2011**).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure dans la formation de molécules aromatiques (alcools, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (**Desmazeaud, 1992 ; Casaburi et al., 2008**).

2. Activité lipolytique :

L'activité lipolytique des bactéries lactiques est moins importante que leurs activités protéolytiques. Les voies métaboliques liées à la lipolyse génèrent des acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires (**Desmazeaud, 1992 ; Casaburi et al., 2008**).

3. Activité aromatisante :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (**Vignola, 2002**). Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Desmazeaud, 1992 ; Casaburi et al., 2008**).

4. Activité acidifiante :

C'est la propriété métabolique la plus recherchée chez les bactéries utilisées dans l'industrie alimentaire. Elle est étroitement associée à la croissance bactérienne et l'accumulation progressive de l'acide lactique. Ce dernier déstabilise les micelles des caséines et induit ainsi la formation du gel résultant de la coagulation du lait suite à la diminution du pH qui participe à la saveur des aliments fermentés et limite les risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux (Desmazeaud, 1992 ; Casaburi *et al.*, 2008).

L'acidité est le plus souvent exprimée en degrés dornic (0.1g de l'acide lactique par 1g de lait), comme elle peut également être exprimée en valeur de pH (Ouahghiri, 2009). C'est cette acidification du milieu qui protégera ensuite le produit fermenté de la contamination par des bactéries pathogènes ou d'altération, facilitera la formation du caillé et créera les conditions optimums pour l'affinage (Aissaoui Zitoun, 2003).

5. Activité texturante :

Les exopolysaccharides sont des macromolécules hautement diversifiées dont les propriétés fonctionnelles sont exploitées dans plusieurs domaines industriels. Ils peuvent être localisés à l'intérieur de la cellule, dans la paroi, ou à la surface bactérienne, avec ou sans attachement (Leveau *et al.*, 1993). Généralement le terme EPS réfère à tous les polysaccharides excrétés à l'extérieur de la cellule bactérienne et relâchés dans le milieu. Ils peuvent alors servir d'émulsifiants ou d'agents gélifiants (Joubert, 2016).

III. Les principaux genres des bactéries lactiques

1. *Lactococcus*

Sont des cocci ou ovoïdes dont la taille varie de 0.5 à 1.5 µm en paires ou en chaînettes. Elles sont des homo-fermentaires qui produisent l'acide lactique L(+) à partir de glucose (Feutry, 2012). Elles sont toutes mésophiles avec une température optimale de croissance variant de 28 à 34°C et leur pH optimal varie de 6.0-6.5 (tableau1) (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995 ; Dellaglio *et al.*, 1994).

2. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs, parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former

des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces. Les souches sont acidophiles qui peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais elles peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C jusqu'à 53°C (tableau1) (**Dellaglio, 1994 ; Tailiez, 2004**).

3. *Leuconostoc*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des cocci, souvent allongées, en paires ou en chaînes. Elles sont toutes des hétéro-fermentaires obligatoires produisant de l'acide lactique de l'éthanol et du CO₂. Elles sont mésophiles avec une température optimale comprise entre 20-30°C (tableau1) (**Dellaglio, 1994 ; Tailiez, 2004**). En production fromagère, ces bactéries sont particulièrement utilisées pour leur capacité de formation des composés aromatiques et de production de CO₂ à partir du métabolisme du citrate.

4. *Streptococcus*

Ce genre est essentiellement constitué des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae*. L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique. La température optimale de croissance est habituellement d'environ 37°C. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz (tableau1) (**Dellaglio, 1994 ; Tailiez, 2004**).

5. *Pediococcus*

Les cellules de ce genre sont immobiles de forme sphérique parfois ovoïde. Elles sont isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant des tétrades. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C (tableau1) (**Dellaglio, 1994**). Elles sont mésophiles et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose. *P. pentasaceus* peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage (**Raimbault, 1995**).

6. *Enterococcus*

Sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaînes courtes ou elles peuvent être disposées en groupes (tableau1) (**Dellaglio, 1994**). Elles peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement

fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également utilisés comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire (Joubert, 2016).

7. *Bifidobacterium*

Considérés comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique . Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Drouault *et al.*, 2001).

Tableau1 : Les genres des bactéries lactiques utilisés en biotechnologie alimentaires et leurs caractéristiques différentielles

Genre	Caractéristiques							
	Forme	CO ₂ à partir du	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6,5%	Croissance à 18%	Croissance à PH 4,4	Croissance à PH 9,6
<i>Aerococcus</i>	cocci	-	+	-	+	-	-	+
<i>Enterococcus</i>	cocci	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i>	bacille	variable	variable	Variable	variable	-	variable	-
<i>Pediococcus</i>	cocci	-	variable	Variable	variable	-	+	-
<i>Leuconostc</i>	cocci	+	+	-	variable	-	variable	-
<i>Oenococcus</i>		+	+	-	variable	-	variable	-
<i>Weissilla</i>		+	+	-	variable	-	variable	-
<i>Lactococcus</i>	cocci	-	+	-	-	-	variable	-
<i>Srtreptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-

IV. Métabolisme des bactéries lactiques

1. Métabolisme des glucides

Le transport membranaire des sucres à l'intérieur est assuré principalement par deux procédés : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) qui couple le transport et la phosphorylation du glucide et le système perméase qui couple la translocation du sucre à celle d'un proton, suivi d'une phosphorylation ultérieure dans la cellule (figure 3) (Novel, 1993; Dortu et Thonart, 2009).

- **Système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) :** a une forte affinité pour le lactose (PTS^{lac}) et plus efficace sur le plan énergétique. Le lactose est hydrolysé par la P-β-galactosidase en glucose et galactose-6-P, le glucose emprunte directement la voie de la glycolyse, le galactose-6-P doit passer par la voie du tagatose avant d'entrer dans la glycolyse (Figure). En plus de l'acide lactique, *Lc. Lactis* produit divers produits finaux comme des acétates, formiates et éthanol (Novel, 1993).

Les systèmes PTS peuvent transporter aussi des β-glucosides tels que l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, l'esculine et la salicine constituées d'un aglycone relié par une liaison β-glucoside à au moins un sucre. Après translocation par le système PTS, le P-glucoside est hydrolysé en glucose et glucose-6-P ou les divers aglycones (Novel, 1993).

- **Système perméase :** après son transfert via le système perméase, le lactose est hydrolysé en glucose et galactose (par la β-galactosidase) qui rejoignent la voie de glycolyse par des voies différentes. le système perméase-β-galactosidase ne joue qu'un rôle mineur dans l'assimilation du lactose par les souches de lactiques (Novel, 1993).
- Un autre système de transport des sucres c'est le mannose-PTS (PTS^{man}) qui peut aussi transporter le mannose, la glucosamine et le fructose (Novel, 1993).

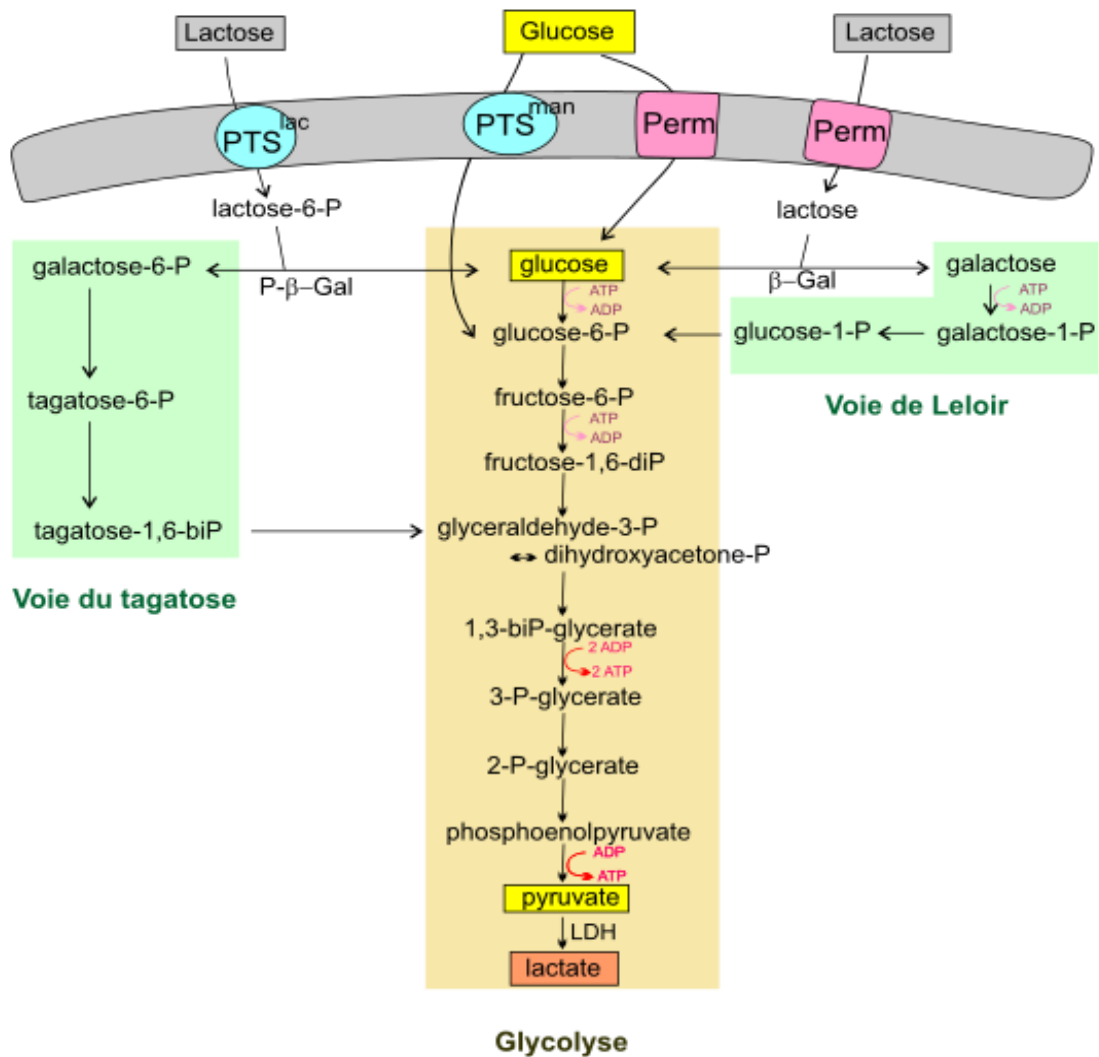


Figure 3 : Métabolisme du lactose et du glucose : le transport membranaire se fait par le système phosphotransférase (PTS) et P-β-galactosidase (P-β-Gal) ou perméase (Perm) et β-galactosidase (β-Gal).

2. Métabolisme du citrate

Certaines bactéries lactiques sont capables de métaboliser l'acide citrique (ou citrate) en condition d'anaérobiose pour produire des composés responsables des arômes des produits laitiers fermentés. L'acide citrique présent dans le lait est considéré comme le principal précurseur de la formation des composés aromatiques appréciés comme l'acétate, l'acétoïne (odeur de beurre), le diacétyl (odeur de fromage) et 2,3-butanediol (arôme beurré) (figure 4) (Leksir, 2013).

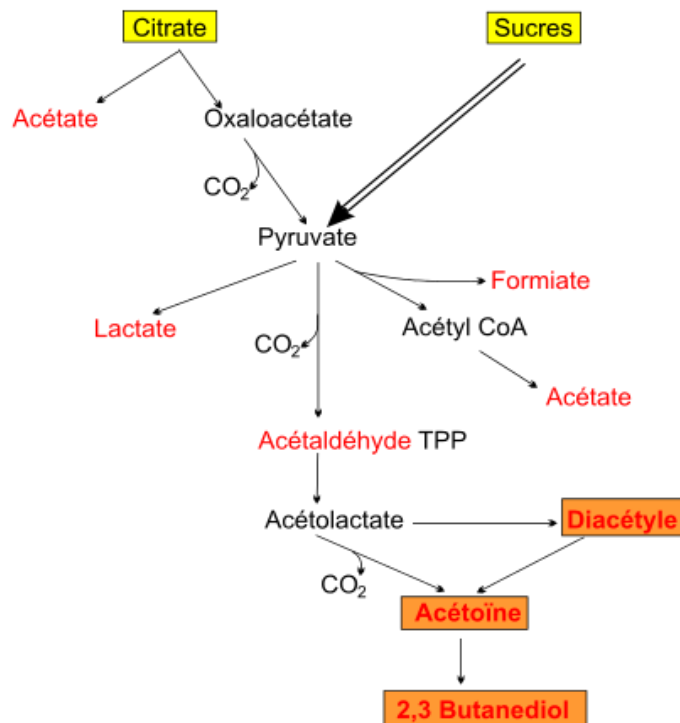


Figure 4 : Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.

Le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule bactérienne par le biais d'une perméase protonique qui a une activité optimale à un pH compris entre 4,45 et 5,2. Le temps durant lequel le produit fermenté reste dans cette zone de pH est directement corrélé avec la quantité de diacétyle produit. Des expériences *in vitro* ont montré plus il y a d'acide lactique et plus la dégradation du citrate est prononcée (Guiraud, 1998).

3. Métabolisme des protéines

Pour leur croissance, les bactéries lactiques ont besoin d'acides aminés mais la concentration de ces derniers est très faible dans le lait et ne peut assurer qu'une part très limitée de la croissance. Un moyen pour obtenir suffisamment d'acides aminés est de recourir à la décomposition des protéines par la voie enzymatique. Ainsi, les bactéries lactiques utilisent la caséine, la protéine la plus abondante du lait, comme source principale d'acides aminés nécessaires à sa croissance (Casaburi *et al.*, 2008).

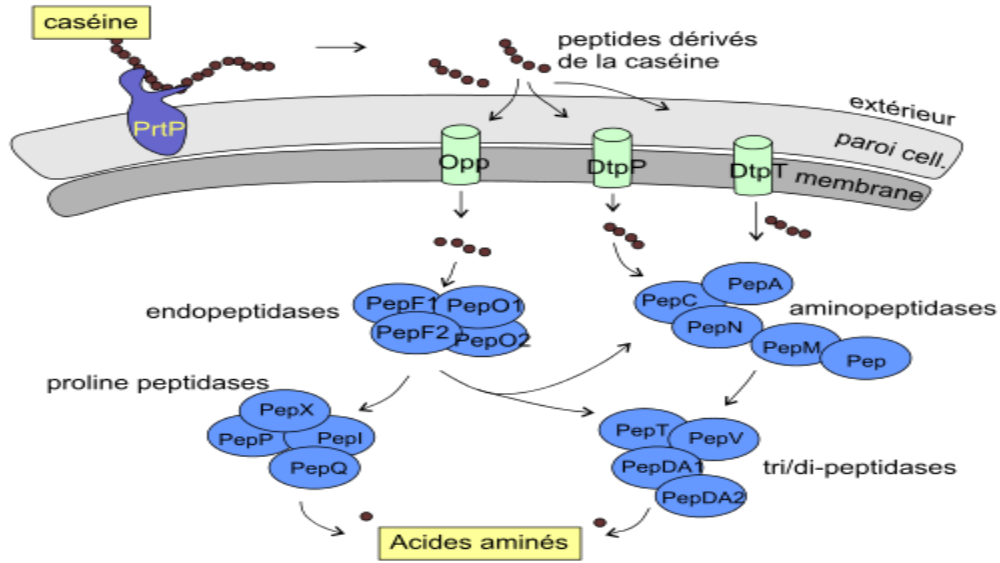


Figure 5: Système protéolytique de *L. lactis*

La machinerie protéolytique du lactocoque est composée : d'une protéase extracellulaire ancrée à la paroi (PrtP), de trois systèmes de transport de peptides et d'un grand nombre de peptidases intracellulaires (figure 5) (Casaburi *et al.*, 2008).

La protéase de paroi PrtP, fixée à l'extérieur de la cellule, est une enzyme à sérine qui hydrolyse les caséines en oligopeptides. Ceux-ci sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule par trois transporteurs. Les peptides sont alors hydrolysés par plusieurs peptidases en acides aminés (Casaburi *et al.*, 2008)

La production d'acide lactique contribue à déstructurer les micelles de caséines et à provoquer leur coagulation. Une fois le caillé égoutté, celui-ci subit une phase d'affinage qui correspond à une digestion enzymatique (Casaburi *et al.*, 2008). La protéolyse est le phénomène dominant de l'affinage. Et à nouveau les lactocoques peuvent jouer un rôle important en raison de leur système protéolytique. Les peptidases intracellulaires peuvent être libérées dans le caillé à la suite de la lyse cellulaire. Elles deviennent alors les principales responsables de la formation de petits peptides et d'acides aminés libres dans le fromage (Matamoros, 2008).

4. Métabolisme des lipides

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils (Karam *et al.*, 2012). Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la saveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters. La figure présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés (figure 6) (Matamoros, 2008).

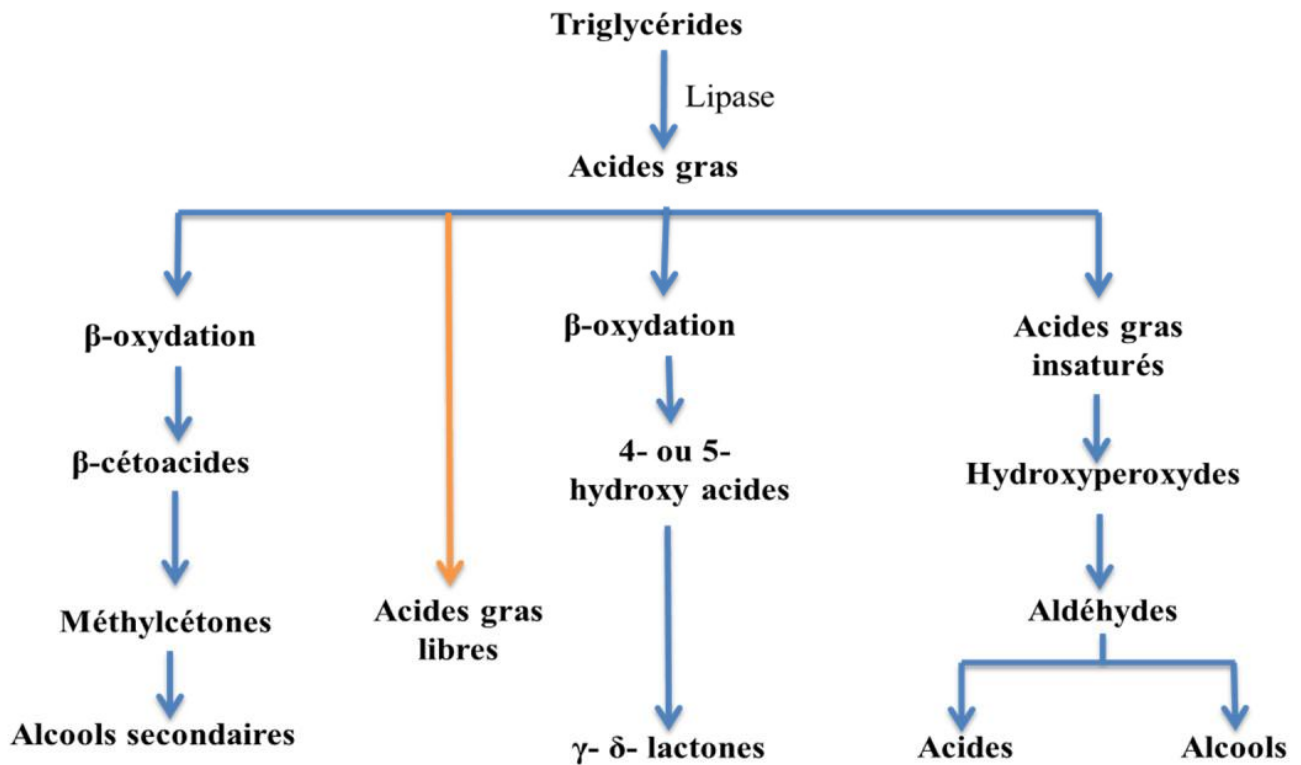


Figure 6 : Principales voies de la lipolyse.

L'intégralité de ce travail est réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de l'université de Jijel et le laboratoire de Biomathématiques Biophysique Biochimie et de Scientometrie de l'Université Abderrahmane MIRA de Bejaia.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Quatre souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* TMG1, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactococcus lactis*) ont été utilisées dans ce travail.

1.2. Appareillage

- Etuve (Memmert) ;
- Autoclave (Pbibrand) ;
- Balance de paillasse (KenRN440-35A) ;
- pH mètre (HANNA) ;
- Bec bunsen ;
- Bain-marie (Memmert);
- Agitateur à plaque chauffante (BUNSEN);
- Compteur de colonies ;
- Vortex (VWR) ;
- Microscope optique (Motic).

1.3. Verrerie

- Tubes à essai et flacons en verre ;
- Pipettes Pasteur et micropipettes ;
- Lames et lamelles ;
- Eprouvettes, bécher, ...

1.4. Milieux de cultures et solutions

- ✓ Gélose et bouillon Man, Rogosa, Sharpe (MRS), pH=6,2 ;
- ✓ Milieu M17 (pH=7,2) ;
- ✓ L'eau physiologique stérile à 0,9% ;
- ✓ Eau distillée stérile ;

- ✓ Eau oxygénée ;
- ✓ Tween 80.
- ✓ Réactifs pour coloration de Gram.

2. Méthodes

2.1. Préparation des souches lactiques

2.1.1. Origine des souches

Lactobacillus plantarum TMG1 isolé du lait de chèvre et identifié génotypiquement par séquençage de l'ADN_r 16S par Mr KHANOUF Tarak ;

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus paracasei* et *Lactococcus lactis* ; ont été isolées à partir de lait cru de vache et identifiées génotypiquement par séquençage de l'ADN_r 16S par Mme AIT MEDDOUR Amel en 2012.

2.1.2. Vérification de la viabilité des bactéries lactiques

Les souches utilisées dans ce travail proviennent des cultures fraîches de 24h à 30°C. Elles étaient repiquées 3 fois consécutives à l'aide d'une pipette pasteur, dans des tubes à essais à raison de 10ml du bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 48h.

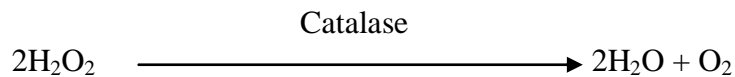
2.1.3. Vérification de la pureté des souches

A partir des cultures fraîches préparées dans le bouillon MRS, l'isolement des souches est réalisé par la technique de stries sur gélose MRS pour les *Lactobacillus*, et sur le gélose M17 pour *Lactococcus*, puis incubées à 30°C pendant 24h à 48 h.

La vérification de la pureté des colonies sur boîtes de pétri après isolement en stries et incubation à 30°C pendant 24 à 48 h consiste à faire :

- Un examen macroscopique comporte l'étude des caractères culturels en observant les colonies des espèces étudiées sur gélose MRS et M17 pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies.
- Une observation sous microscope des cellules après coloration de Gram qui permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (Pilet *et al.*, 1998).

- Un test de catalase a été effectué pour mettre en évidence la production de cette enzyme et distinguer les bactéries ayant un métabolisme fermentaire ou oxydatif. La méthode de recherche consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (**Pilet *et al.*, 1998**).



2.1.4. Conservation des souches

Après la confirmation par l'observation macro et microscopique des colonies et des cellules après coloration de gram et le teste de catalase. Les souches sont conservées par ensemencement dans des tubes contient de la gélose MRS inclinée incubés à 30°C pendant 24h puis conservés à 4°C durant un mois pour les utiliser dans les tests de l'activité acidifiante, protéolytique et lipolytique.

2.1.5. Détermination de l'inoculum standard

Cette étape a pour finalité de travailler avec le même nombre de cellules par millilitre durant toute l'étude pour estimer le pouvoir acidifiant, l'activité protéolytique et lipolytique.

Lactococcus lactis est mis en culture dans le bouillon M17 et les *Lactobacillus* dans le bouillon MRS. Après incubation à 30°C pendant 24h, des boites de Pétri contenant la gélose M17 et MRS sont ensemencées par stries et incubées 24h à la même température.

Deux colonies identiques de chaque espèce sont utilisées pour inoculer, séparément, quatre tubes à essais contenant 5 ml des bouillons MRS et M17. Après 24h d'incubation à 30°C, 1 ml de chaque tube a été prélevé pour la réalisation des dilutions décimales (10⁻⁵ à 10⁻¹⁰), puis un dénombrement est effectué par un ensemencement de deux boites de Pétri gélosées pour chaque espèce, (M17) pour *Lactococcus lactis* et (MRS) pour les *Lactobacillus*.

Le nombre de cellules est déterminé après 24h d'incubation à 30°C en calculant la moyenne des deux boites de Pétri. Le nombre de colonies donnant le plus grand nombre entre (15 et 150) de cellules est sélectionné pour la mise au point de l'inoculum standard.

Le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon est déterminé à l'aide de la formule suivante (Pilet *et al.*, 1998) :

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0,1n2)d}$$

Où :

C: Somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions ;

Successives et dont au moins une contient 30 colonies ;

V: Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n1: Nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n2: Nombre des boîtes retenues à la seconde dilution ;

d: Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

2.2. Etude de quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques

Pour étudier quelques propriétés technologiques (pH, la protéolyse et la lipolyse) de ces bactéries lactiques et les interactions qui peuvent se produire entre eux, nous avons procédé aux étapes suivantes :

En premier temps, une suspension bactérienne de chaque souche est réalisée en ajoutant 4 colonies dans 10ml de l'eau physiologique stérile. Puis des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-6} .

En deuxième temps, des mélanges des souches bactériennes (tableau 2) ont été réalisés en mélangeant des volumes égaux de la dilution 10^{-6} pour chaque souche en utilisant le plan à 14 tests donné par le logiciel JMP et en appliquant le plan de mélange. Les tubes et les boîtes témoins sont notés par le chiffre 15.

Tableau 2 : Les mélanges des souches lactiques.

N°	<i>Lb. plantarum</i> TMG1 (μ l)	<i>Lb. plantarum</i> (μ l)	<i>Lb. paracasei</i> (μ l)	<i>Lc. lactis</i> (μ l)
1	333	333	333	0
2	333	333	0	333
3	333	0	333	333
4	0	333	333	333
5	500	500	0	0
6	500	0	500	0
7	500	0	0	500
8	0	500	500	0
9	0	500	0	500
10	0	0	500	500
11	1000	0	0	0
12	0	1000	0	0
13	0	0	1000	0
14	0	0	0	1000
15	0	0	0	0

2.2.1. Activité acidifiante

Il consiste à étudier l'acidification du lait écrémé stérile durant 5 jours à 12°C et 30°C par différentes cultures de bactéries lactiques.

Chaque souche et mélange bactérien est ensemencé dans deux tubes à essais contenant 10 ml de lait écrémé stérile. Ensuite un tube est incubé à 12°C et l'autre tube à 30°C pendant 5 jours. Après l'incubation le pH de chaque tube est mesuré. Une mesure du pH initiale (pH_0) du lait écrémé stérile est faite à l'aide d'un pH-mètre (figure 7).



Figure 7: Test de mesure du pH

2.2.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est recherchée en milieu solide MRS gélose additionné du lait écrémé stérile à 10 % en utilisant la méthode des spots.

Dans deux séries des boîtes de Pétri contient la gélose MRS additionnées du lait écrémé et étiquetées de 1 à 15, un volume de 5 μ l de chaque mélange et souche a été déposé en spots puis une série de 15 boîtes a été incubée à 12°C et l'autre série à 30°C pendant 5 jours.

La protéolyse se manifeste par une zone d'un halo clair autour des spots et l'enregistrement des résultats a été effectué par mesure des diamètres des zones de protéolyses en millimètre.

2.2.3. Activité lipolytique

L'activité lipolytique est recherchée sur milieu solide MRS gélose additionné de la matière grasse cible, préparée du lait de chèvre, à 10% en utilisant la méthode des spots.

La préparation de la matière grasse de lait de chèvre est effectuée par la méthode de modifiée en utilisant la crème fraîche récupérée du lait de chèvre comme suite :

Un litre de lait de chèvre est mis dans un bécher ce dernier est introduit dans un autre bécher contenant de l'eau et de la glace. Le lait est soumis sous une agitation à froid à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à émergence de la matière grasse. Puis 46g de la crème fraîche sont mis dans 50ml de l'eau distillée additionné de 0,5ml de Tween 80 avec agitation jusqu'à la formation d'une émulsion. Enfin un volume de 10ml de la matière grasse a été mis dans des tubes à essais, et autoclavé pendant 10min à 110°C.

Dans deux séries des boîtes de Pétri étiquetées de 1 à 15, la gélose MRS additionné de la solution lipidique de matières grasses de lait de chèvre à 10% est coulée puis après solidification, un volume de 5µl de chaque mélange des souches (tableau 2) a été déposé en spots puis incubées à 12°C et à 30°C pendant 5 jours.

La lipolyse se manifeste par un halo opaque autour des spots. L'enregistrement des résultats a été effectué par mesure des diamètres des zones de protéolyses en millimètre.

2.3. Analyse statistique

Le logiciel utilisé pour réaliser l'approche des plans d'expérience est le JMP, SAS Institute. C'est un programme informatique de statistiques mis au point par la division JMP de l'institut SAS.

1. Revivification des souches lactiques

La revivification a été faite dans le bouillon MRS et M17, ces milieux deviennent troubles après chaque incubation ce qui montre que les quatre souches lactiques sont viables.

2. Vérification de la pureté des souches lactiques

Les résultats de l'observation microscopique et le test catalase des quatre souches lactiques sont montrés dans le tableau 3.

Les résultats obtenus montrent des colonies homogènes pour chaque espèce ensemencée et ont un aspect typique. Les souches *Lb. plantarum* TMG1, *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei* donnent des colonies blanches, rondes, régulières et de grande taille, les colonies de *Lc. Lactis* sont blanches, crémeuses rondes et de petites taille confirmant que ces souches sont pures.

Tableau 3 : L'aspect des colonies sur gélose et le mode de regroupement.

Souches	Aspect des colonies sur gélose	Aspect des cellules et le mode de regroupement	Gram	Catalase
<i>Lb. plantarum</i> TMG1	Blanches, rondes ou lenticulaires	Petit bâtonnets en paires ou en chainettes	+	-
<i>Lb. plantarum</i>	Blanches, rondes ou lenticulaires	Petit bâtonnets en paires ou en chainettes	+	-
<i>Lb. paracasei</i>	Blanches, rondes ou lenticulaires	Petit bâtonnets en paires ou en chainettes	+	-
<i>Lc. lactis</i>	Blanches, rondes ou lenticulaires et petites	Cocci en diplocoques	+	-

3. Standardisation de l'inoculum :

Les résultats de la standardisation de l'inoculum pour les 4 souches utilisées sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats de standardisation de l'inoculum.

Espèce	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>
Nombre de cellules (ufc/ml)	$5,7.10^9$	$1,9.10^{12}$	$1,65.10^8$	3.10^8

4. Activité acidifiante

Les résultats de pH obtenus pour les souches et les combinaisons étudiés après 5 jours d'incubation à 12°C sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les résultats de l'étude de l'activité acidifiante des bactéries lactiques à 12°C.

N°	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	pH
1	1	1	1	0	6,3
2	1	1	0	1	6
3	1	0	1	1	5,8
4	0	1	1	1	6
5	1	1	0	0	6,2
6	1	0	1	0	6
7	1	0	0	1	5,9
8	0	1	1	0	5,9
9	0	1	0	1	5,9
10	0	0	1	1	5,7
11	1	0	0	0	5,7
12	0	1	0	0	5,7
13	0	0	1	0	5,6
14	0	0	0	1	5,7
15	0	0	0	0	6,7

Les résultats obtenus montrent que les quatre bactéries et leurs mélanges utilisés provoquent une diminution du pH du lait par rapport au témoin (pH 6,7). Les profils d'acidification du lait diffèrent selon les souches et les combinaisons utilisées. Parmi ces bactéries, la souche *Lb. paracasei* a montré une forte diminution de pH du lait (pH 5,6). Les souches *Lb. plantarum* TMG1, *Lb. plantarum*, *Lc. Lactis* et les mélanges (10, 3, 7, 8 et 9) ont presque le même profil de réduction de pH dont le mélange (10) est le plus acidifiant. Tandis que le laitensemencé par les autres mélanges montre une très faible diminution du pH.

Les résultats de pH de l'étude de l'activité acidifiante des souches et leurs mélanges à 30°C sont représentés dans le tableau 6. D'après ce dernier le pouvoir acidifiant du milieu est remarquable pour la plupart des souches et des mélanges étudiés à 30°C par rapport au témoin.

Tableau 6: Les résultats de l'étude de l'activité acidifiante des bactéries lactiques à 30°C.

N°	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	Mesure du pH
1	1	1	1	0	4,6
2	1	1	0	1	4,6
3	1	0	1	1	4,7
4	0	1	1	1	4,4
5	1	1	0	0	4,6
6	1	0	1	0	4,7
7	1	0	0	1	4,4
8	0	1	1	0	4,1
9	0	1	0	1	5,8
10	0	0	1	1	4,2
11	1	0	0	0	5,3
12	0	1	0	0	5,3
13	0	0	1	0	4
14	0	0	0	1	4,3
15	0	0	0	0	6,7

La plus forte acidification est due à *Lb. paracasei* (pH= 4) suivi par les mélanges (8, 10, 7, 4) avec un pH varie entre 4,1 et 4,4. Les autres sont moins acidifiants. La forte acidification du milieu à 30°C pour la majorité des souches et mélanges est conséquence à l'optimum de température de croissance de ces bactéries qui situe autour de 30°C [30].

5. Activité protéolytique

Les résultats de la protéolyse obtenus à 12°C sont résumés dans les tableaux 7. Certaines souches et mélanges de bactéries lactiques testées à 12°C possèdent une capacité importante à dégrader les caséines trouvées dans le milieu de culture utilisé et présentent une croissance avec une activité protéolytique bien déterminée par la formation d'un halo.

Tableau 7 : Les résultats de l'étude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques à 12°C.

N° de la boîte de Pétri	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	Diamètre de la zone de la protéolyse (mm)
1	1	1	1	0	0
2	1	1	0	1	0
3	1	0	1	1	20
4	0	1	1	1	20
5	1	1	0	0	0
6	1	0	1	0	14
7	1	0	0	1	0
8	0	1	1	0	18
9	0	1	0	1	0
10	0	0	1	1	17
11	1	0	0	0	0
12	0	1	0	0	0
13	0	0	1	0	17
14	0	0	0	1	0
15	0	0	0	0	0

La plus grande activité protéolytique observée pour les mélanges (3 et 4) suivi des mélanges (8, 10) moyennement protéolytiques puis le mélange (6) qui a un faible pouvoir protéolytique et en fin les mélanges 1, 2, 5, 7, 9, 11, 12 et 14 n'ont enregistré aucun effet protéolytique. Après analyse de ces résultats nous avons constaté qu'à 12°C l'activité protéolytique est principalement liée à l'espèce *Lb.*

paracasei et les mélanges qui contiennent ce dernier. Selon les résultats on observe un effet synergique entre *Lb. paracasei* et *Lc. lactis* qui traduit par une forte activité protéolytique. Par contre il ya un effet antagoniste entre la combinaison *Lb. plantarum* TMG1 et *Lb. paracasei* en conséquence il ya diminution de l'activité protéolytique. L'activité protéolytique est liée principalement à *Lb. paracasei* et les mélange dont il fait partie et dépend aussi de la température d'incubation (12°C) qui est favorable pour certaines souches mais pas pour les autres (**Benazzouz, 2012**).

L'étude de la protéolyse à 30°C par les lactiques utilisées sont montrés dans le tableau 8.

Tableau 8: Les résultats de l'étude de l'activité protéolytique des bactéries lactiques à 30°C.

N° de la boîte de Pétri	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	Diamètre de la zone de la protéolyse (mm)
1	1	1	1	0	16
2	1	1	0	1	16
3	1	0	1	1	17
4	0	1	1	1	12
5	1	1	0	0	13
6	1	0	1	0	19
7	1	0	0	1	20
8	0	1	1	0	18
9	0	1	0	1	14
10	0	0	1	1	14
11	1	0	0	0	16
12	0	1	0	0	12
13	0	0	1	0	12
14	0	0	0	1	20
15	0	0	0	0	0

Après 5 jours d'incubation à 30°C, des activités protéolytiques positives sont observées pour les 4 souches et les mélanges étudiés, le témoin ne présente aucune activité. La souche *Lc. lactis* et le mélange (*Lb. plantarum* TMG, *Lc. Lactis*) représente la plus grande activité protéolytique. Une activité protéolytique moyenne est observé pour la souche *Lb. plantarum* TMG1 et les mélanges 1, 2, 3, 6,7 et 8. Le reste des souches et mélanges sont faiblement protéolytiques (**Feutry et al., 2012**).

Cela est dû au fait que la température 30°C est favorable pour la croissance de toutes les bactéries utilisées et à exercer la protéolyse des protéines du lait par leurs enzymes vu que la durée d'incubation

est longue. Les combinaisons entre ces bactéries sont différentes, certaines sont synergiques et améliore l'activité protéolytiques c'est le cas des combinaisons 1, 2, 3, 6 et 7.

6. Activité lipolytique

Après incubation à 12°C, les résultats de l'activité lipolytique des 4 souches utilisées et leurs mélanges sont démontrés dans le tableau 9.

Tableau 9: Les résultats de l'étude de l'activité lipolytique des bactéries lactiques à 12°C.

N° de la boîte de Pétri	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	Diamètre de la zone de la lipolyse (mm)
1	1	1	1	0	0
2	1	1	0	1	0
3	1	0	1	1	0
4	0	1	1	1	0
5	1	1	0	0	0
6	1	0	1	0	10
7	1	0	0	1	0
8	0	1	1	0	9
9	0	1	0	1	0
10	0	0	1	1	13
11	1	0	0	0	0
12	0	1	0	0	0
13	0	0	1	0	14
14	0	0	0	1	0
15	0	0	0	0	0

A 12°C, la souche *Lb. paracasei* et les 3 mélanges (6, 8,10) sont seules qui présentent une activité lipolytique. La plus grande activité lipolytique est observé avec la souche *Lb. paracasei*, suivi par le mélange (*Lb. paracasei* +*Lc. Lactis*) qui a presque la même activité lipolytique. Les mélanges (6 et 8) ont une faible lipolyse.

Les résultats obtenus à 12°C montrent que la température influe le métabolisme des bactéries lactiques qui ont presque tous une température de croissance proche de 30°C.

L'étude des combinaisons entre les souches utilisées a démontré qu'ils inhibent l'activité lipolytique de la souche *Lb. paracasei* (Karam et al., 2012).

Les résultats de la lipolyse des 4 souches utilisées et leurs mélanges et incubés à 30°C sont démontrés dans le tableau 10. Les résultats montrent que toutes les souches et leurs mélanges utilisés dans l'étude de la lipolyse à 30°C ont une activité lipolytique par rapport au témoin (15). La souche *Lb. paracasei* et les mélanges (6, 1) sont fortement lipolytique. Les autres souches et mélanges sont faiblement lipolytique et ont en générale le même pouvoir lipolytique (**Karam et al., 2012**).

Tableau 10: Les résultats de l'étude de l'activité lipolytique des bactéries lactiques à 30°C.

N° de la boîte de Pétri	<i>Lb. plantarum</i> TMG1	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	Diamètre de la zone de la lipolyse (mm)
1	1	1	1	0	15
2	1	1	0	1	10
3	1	0	1	1	9
4	0	1	1	1	13
5	1	1	0	0	10
6	1	0	1	0	15
7	1	0	0	1	12
8	0	1	1	0	13
9	0	1	0	1	13
10	0	0	1	1	12
11	1	0	0	0	12
12	0	1	0	0	12
13	0	0	1	0	15
14	0	0	0	1	11
15	0	0	0	0	0

Le pouvoir lipolytique de toutes les souches et mélanges s'explique par la température de 30°C qui favorise la croissance et le métabolisme des 4 souches utilisées. Les mélanges 2 et 7 montrent des interactions synergiques entre les souches qui les composent. On observe aussi que les *Lactobacillus* est plus lipolytique que le *Lactococcus* ce qui est en accord avec les résultats rapportés par (**Karam et al., 2012**).

7. Analyse des résultats

Les données expérimentales obtenues à 12°C pour les 14 mélanges obtenus par un plan de mélanges sont illustrées dans le tableau 11.

Tableau 11: Plan de mélanges des souches bactériennes et les repenses

X1 Lactobacillus TMG1 (ufc/ml)	X2 Lactobacillus plantarum (ufc/ml)	X3 Lactococcus paracasei (ufc/ml)	X4 Lactococcus lactis (ufc/ml)	Protéolyse (mm)	Lipolyse (mm)	pH
1	0	0	0	20	0	5,8
0,33333391	0	0,33333217	0,33333391	18	9	5,9
0	0,33333263	0,33333263	0,33333474	0	0	5,9
0,3333327	0,3333327	0,3333346	0	17	13	5,7
0,5	0	0	0,5	20	0	6
0	0,5	0,5	0	0	0	5,7
0	0,5	0	0,5	0	0	5,7
0,5	0	0,5	0	0	0	5,7
0,5	0,5	0	0	0	0	6,2
0	0	0	1	0	0	5,9
0	0	0,5	0,5	14	10	6
0,33333268	0,33333268	0	0,33333464	17	14	5,6
0	1	0	0	0	0	6
0	0	1	0	0	0	6,3

Les réponses mesurées sont comparées à celles prédites pour l'estimation de l'écart et l'erreur expérimentale afin de vérifier la validité du modèle choisi.

Le coefficient de détermination traduit la contribution du modèle dans la restitution de la variation de la réponse observée. Plus la valeur du coefficient de détermination ajustée est proche de 1, plus la qualité descriptive du modèle est satisfaisante.

Par conséquent, le modèle utilisé pour ajuster les réponses (activités acidifiante, protéolytique et lipolytique) est significatif et adéquat pour représenter les relations entre les réponses et les variables étudiées dans notre cas les bactéries lactiques mais uniquement à 12°C. Le coefficient de corrélations R^2 lors de l'étude à 30°C n'est pas significatif.

L'optimisation du mélange de souches donnant de bonnes activités acidifiante, protéolytique et lipolytique à 12°C sont mise en place par le profil de prédiction qui est illustré dans la figure 9 ci-après:

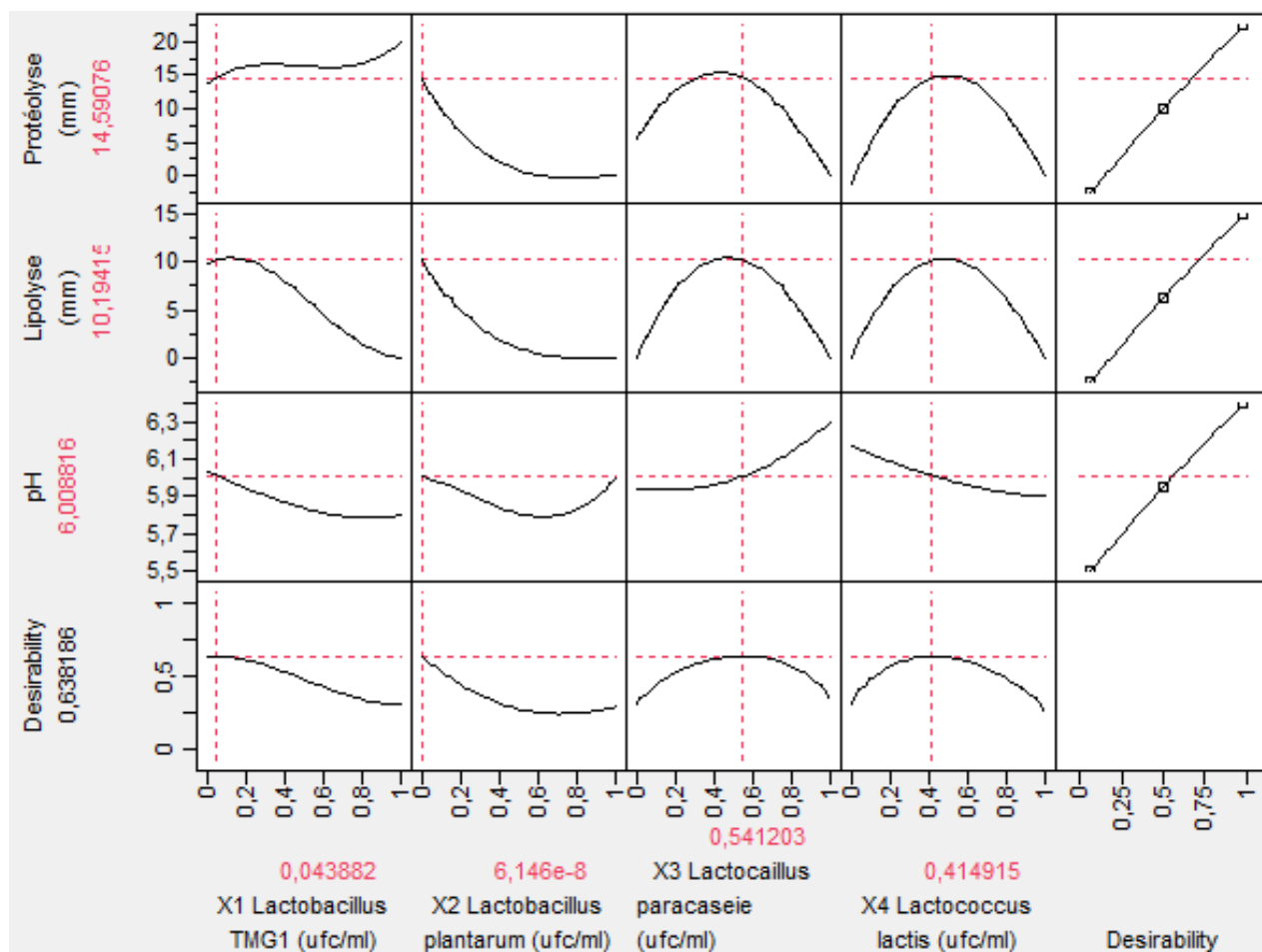


Figure 9: profil de prédiction du mélange le plus approprié

D'après les résultats illustrés dans la figure 9, on constate que les activités acidifiante, protéolytique et lipolytique dépendent significativement de mélange de souches utilisées au niveau de confiance de 95% avec 5% de risque d'erreur.

En tâtonnant dans le domaine d'études des facteurs en question, on remarque que les réponses (activités acidifiante, protéolytique et lipolytique) variées positivement ou négativement selon des souches présente dans les essais. On constate que la meilleur combinaison qui jumelle à la fois une bonne protéolyse et lipolyse est la combinaison de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei* avec des volumes respectif de 0,54 μ l et 0,41 μ l en donnant des diamètres de protéolyse et de lipolyse de 14,59 et 10,19 mm respectivement.

Conclusion

L'objectif de la présente étude consiste à caractériser quatre souches lactiques (*Lactobacillus plantarum* TMG1, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactococcus lactis*), préalablement identifiées, pour leurs propriétés technologiques. Cela pour déterminer les interactions positives et négatives qui se produisent entre ses bactéries dans le but de sélectionner les plus performantes pour les caractères technologiques les plus intéressants dans le domaine de l'industrie agroalimentaire (acidification, protéolyse et lipolyse).

L'étude des aptitudes technologiques des souches en culture pure et mixte et à deux températures différentes (12°C et 30°C), nous a permis de démontrer que les quatre bactéries et leurs mélanges utilisées provoquent une diminution du pH du lait par rapport au témoin par acidification du milieu. Ils montrent aussi qu'ils possèdent une activité protéolytique et lipolytique pour certaines souches et mélanges bien que d'autres n'ont pas.

L'analyse des résultats obtenus montre que les résultats de l'acidification, la protéolyse et la lipolyse à 12°C ont une signification et varient positivement ou négativement, cela dépend étroitement des souches présentes dans le mélange testés. Contrairement à 30°C les résultats des essais n'ont pas une signification. La meilleure combinaison des souches lactiques utilisées qui jumelle la bonne activité protéolytique et lipolytique est celle de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei* avec des volumes respectifs de 0,54 µl et 0,41 µl en donnant des diamètres de protéolyse et de lipolyse de 14,59 mm et 10,19 mm respectivement.

En perspective, il est intéressant de poursuivre l'étude en examinant d'autres aspects à savoir :

- Recherche de nouvelles souches lactiques acidifiantes, lipolytiques et protéolytiques.
- Étudier la possibilité d'utiliser d'autres combinaisons et optimiser les conditions de culture pour une meilleure détermination de leurs propriétés technologiques.

Étudier d'autres paramètres technologiques (aromatisation, probiotique ...).

Références bibliographiques

Ababsa A., 2012. Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de magister en génie microbiologie, université Ferhat Abbas Sétif.

Aissaoui Zitoun O., 2003. Fabrication et caractéristiques d'un fromage traditionnel algérien bouhezza. Thèse de magister. Constantine.

Allouche F. N., Hellal A. et Laraba A., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 3 :13- 20.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.

Badis A., Laoubdia-Sellami N., Guetarnie D., Kihal M. et Ouzrout R., 2005. Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales <<Arabia et kabyle>>. *Sciences et technologie*, 23 : 79-89.

Benazzouz D., 2012. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle). Mémoire Magister en Agronomie. Ecole national d'agronomie El-harrach Alger.

Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldra, F., Ercolini, D., Villani, F., 2008. proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food microbiology*, 25 : 335-347

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley Loubiere P.,1995. Rational development of a simple sythetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 108-116.

Dellaglio F., Roissart H., Torriani S., Curk C., M. Jenssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Lorica, Uriage*. 25-116.

Desmazeud M., 1992. Les bactéries lactiques in : Les groupes microbiens d'intérêt laitier.

Dortu C. et Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires *Biotechnology Agronomy Society and Environement*, 13: 143-154.

Drouault S. et Corthier G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32 : 101-117.

Feutry F., Torre P., Arana I., Garcia S., Desmasures N., Casalta E., 2012. *Lactococcus lactis* strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity. *Dairy Sci. & Technol*, 92:655–670

Feutry F., Torre P., Arana I., Susana Garcia S., J. Perez Elortondo F., Berthier F., 2016. Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses. *Food Microbiology*, 56: 52-68

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. BUNOD. Paris.

Joubert D., 2016. Les ferments lactiques. *Revue des ENIL*. N°345 : 2-19

Kalbaza K., Zadi-Karam H., Karam N., 2018. Identification and major technological characteristics of *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains isolated from "hamoum", an Algerian fermented wheat. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 17(5), pp. 108-117, 31

Karam N., Dellali A. et Zadi-Karam H., 2012. Activité lipolytique chez les bactéries lactiques, *Renc. Rech. Ruminants* 19.

Khodja B., 2018. Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine. Thèse Doctorat. Université de Sidi Bel Abbès.

Leksir C., 2013. Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. Mémoire de Magistère. Université Mentouri de Constantine.

Leveau J., Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 612 p.

Lortal S., 2015. Ferments et aliments : une longue histoire riche d'enseignements. *Innovations Agronomiques*, 44 : 1-13

Maghnia D., 2011. Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens. Mémoire de Magister. Université d'Oran.

Matamoros S., 2008. Caractérisation de bactéries lactiques psychotropes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat. Université de Nantes.

Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzappel W.H., 2004. *Int. J. Food Microbiol.* 94 : 269.

Novel G., 1993. Les bactéries lactiques. In : Leveau J.Y. et Bouix M., *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Techniques et Documentation, Lavoisier. Paris, 170-374.

Ouadghiri M., 2009. Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc.

Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 1998. Bactéries lactiques. *In* : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.

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

Rabah N., 2010. Etude du potentiel des bactéries lactiques pour leur utilisation en industrie laitière, p16, 27.

Raimbault M., 1995. Éditions ORSTOM, Importance of lactic acid bacteria in cassava fermentation, 260-275

Tailiez P., 2004. Les lactobacilles : propriétés, habitat, rôles physiologiques et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 6 : 35-41.

Tailiez P., 2001. Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. 81: 1-11.

Vignola C.L. 2002. Science et technologie du lait. Presses Internationales Polytechnique. Montreal.

Wilson A.R., Signee D. et Epton H. A. S., 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* due to lactic acid production. *J. Appl. microbiol.* 99: 1516-1522.

Annexe

Techniques de coloration de Gram

1. Préparation de frottis

Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame ;

Étaler avec la pipette sur la lame, de façon à obtenir un étalement mince ;

Sécher et fixer en portant la lame au-dessus de la flamme du Bec Bunsen.

2. Coloration

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, et laisser agir 1 min puis jeter l'excès ;

Déposer quelques gouttes de Lugol, laisser agir quelques secondes ;

Rincer à l'eau Contre –colorer en déposant la Fushine pendant 1 minute ;

Rincer à l'eau ;

Laisser sécher à l'air ;

Déposer une goutte de l'huile à émersion ;

Observer au microscope optique ($G \times 100$), la forme, la disposition, et le Gram (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).

Constituants des milieux de cultures et solution

- **Bouillon MRS (pH=6.2)**

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80.....	1 ml
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

- **M17 (pH=7,2)**

Peptone papainique de soja	5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	2,5 g
□-Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée qsq	950 ml

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.

- **Eau physiologique (pH= 7)**

Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée qsp	1000 ml
Peptone	0,5 g