

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

Mistère de l'enseignement Supérieur  
et de la recherche scientifique  
Centre Universitaire Abdel hak ben Hamouda  
Jijel  
Institut de biologie

وزارة التعليم العالي  
و البحث العلمي  
المركز الجامعي عبد الحق بن حمودة  
جيجل  
معهد البيولوجيا

# Memoire

En vue de l'obtention du diplôme  
d'études supérieures en biologie  
moléculaire et cellulaire  
Option : Microbiologie

## THEME

*Contribution à l'étude de la symbiose entre  
Streptococcus salivarius subsp. thermophilus  
et Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus  
utilisées pour la fabrication du yaourt*

Membres de jury :

- Mr MAYACHE Boualem : Président
- Mr HAMAMES N/Edinne : Encadreur
- M<sup>me</sup> ROULA Sagia : Examineur

Présenté Par :

- BOULAICHE Djamila
- SEBTI Nadjet

Promotion 2001

# Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu dieu, le tout puissant qui nous a donné la volonté de réaliser ce modeste travail.

Nous remercions vivement notre encadreur monsieur :  
HAMAMES Nouredinne pour son aide précieuse.

Sans oublier le groupe de notre laboratoire, et les agents de la chambre de stérilisation de l'hôpital « Jijel », nos collègues, ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin matériellement ou moralement.

## ***ABREVIATION***

- G ( I,II ,III) : Groupe ( I ,II ,III).
- gal : galactose .
- LDH : Lactate d'ésydrogénase .
- Lb : Lactobacillus.
- Lb<sub>1</sub>: Lactobacillus bulgaricus de 1<sup>er</sup> échantillon.
- Lb<sub>2</sub> : Lactobacillus bulgaricus de 2<sup>eme</sup> échantillon .
- Leu : Leucomostoc.
- Nbes : Nombres.
- Nbr esp : nombre d'espèces.
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
- p : phosphate.
- PM : poids moléculaire .
- P/V : poids / volume.
- PEP: phosphoénolpyruvate.
- PK: pyruvate kinase.
- PTS: système phosphotransférase .
- qps: quantité suffisante pour .
- St : Streptococcus.
- St<sub>1</sub> : Streptococcus thermophilus de 1<sup>er</sup> échantillon.
- St<sub>2</sub> : Streptococcus thermophilus de 2<sup>eme</sup> échantillon.
- V/V : Volume / Volume .
- Vmg / h : vitesse mg /h .

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>PARTIE I : Etude bibliographique</b>	2
<b>I. Microbiologie du lait</b>	3
I.1. Flore microbienne du lait	3
I.2. Flore de contamination	3
<b>II. Les bactéries lactiques</b>	4
II.1. Généralité	4
II.2. Origine	5
II.3. Classification	6
II.3.1. Genre Lactobacillus	6
II.3.2. Genre Streptococcus	7
II.4. Taxonomie	7
II.4.1. Caractères morphologiques	7
II.4.2. Caractères physiologiques	8
II.4.3. Caractères structuraux	9
II.4.4. Caractères biochimiques	10
II.5. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	11
II.5.1. Utilisation du lactose	11
II.5.2. Utilisation des peptides et des acides aminés	16
II.5.3. Exigences vitaminiques	18
II.5.4. Influence des minéraux	18
<b>III. les levains lactiques et les phénomènes de symbiose et d'antibiose</b>	19
III.1. Les levains lactiques	19
III.1.1. Définition	19
III.1.2. Les différents types de levain lactique	19
a. Les ferments multiples	19
b. Les ferments mixtes	19
III.2. Phénomène de coopération ou symbiose	20
III.3. Phénomène d'inhibition ou antibiotiques	21

## **INTRODUCTION :**

Les ferments lactiques jouent un rôle très important dans l'industrie laitière (HEMME et al., 1986). L'une des principales caractéristiques de ces bactéries est de produire, à partir de lactose du lait, des quantités importantes d'acide lactique, par leur métabolisme secondaire, elles contribuent à l'élaboration d'arôme (DEROISSART, 1986).

Les bactéries lactiques cultivées dans le lait sont utilisées comme levains servant àensemencer les cuves de fabrication. Généralement les bactéries lactiques sont utilisées soit en mélange des souches d'une même espèce (ou de plusieurs espèces), soit en association d'espèces ou de germes différents.

Des recherches récentes analysent les interactions positives (Symbiose) et négatives (Antibiose) existant entre les divers levains lactiques utilisés dans l'industrie laitière, en particulier le cas d'association du Streptococcus salivarius subsp. thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, pour la fabrication du yaourt, l'exemple le plus connu et probablement l'association la plus stable (NOVEL, 1993).

Afin d'obtenir plus d'information sur la relation symbiotique entre ces deux espèces nous avons essayé de réaliser un travail ayant le but de comparer le pouvoir acidifiant des cultures pures de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus et des cultures mixtes de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.

# *PARTIE I*

*ÉTUDE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

# **I. MICROBIOLOGIE DU LAIT :**

## **I.1. Flore microbienne du lait :**

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 1000 germes/ml) (LARPENT, 1978). Selon le même auteur, le nombre de micro-organismes augmente avec la température et le temps de stockage (tableau 1).

Il s'agit essentiellement des germes saprophytes du Pis (micrococques et lactobacilles), d'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux (germes de mammites, streptocoques pyogènes, corynébactéries pyogènes, staphylocoques et germes d'infection générale) (GUIRAUD et GALZY, 1980).

**Tableau 1 : Microflore totale d'un lait à différentes températures (LARPENT, 1987)**

	<i>Nombre de bactéries par ml</i>		
	à 15 °C	à 25 °C	à 35 °C
Au prélèvement	9000	9000	9000
3 heures après	10000	18000	30000
6 heures après	25000	172000	12 millions
9 heures après	46000	1 million	34 millions
1 jour après	5 millions	57 millions	800 millions

## **I.2. Flore de Contamination :**

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines divers (LARPENT, 1987).

- *Fécès* : Coliformes, clostridies éventuellement entérobactéries pathogènes (Salmonella ...).
- *Sol* : streptomyces sporulées, spores fongiques ...

- *Litière et aliments* : Flore banale variée en particulier lactobacilles, clostridium butyriques (ensilage).
- *Air et eau* : Flore diverse (streptocoques fécaux, microcoques, moisissures ...)
- *Équipement de traite et de stockage du lait* : Flore lactique, microcoques, lactobacilles, streptocoques, leuconostoc et levures.
- *Manipulateurs* : Flore de contamination fécale, staphylocoques, entérobactéries, microcoques, corynebactéries, Streptococcus pyogenes.
- *Tank à lait* : Yersinia, pseudomonas

## **II. LES BACTÉRIES LACTIQUES :**

### **II.1. Généralité :**

Les bactéries lactiques décrites pour la première fois par ORLA-JENSEN en 1919 citées par Pilet et al., 1998. Elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres de bactéries Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communs, mais par fois peu d'homologie de leurs acides nucléiques.

- Ce sont des bactéries immobiles, asporulées catalase et oxydase négative, nitrate reductase négative, anaérobies ou aérotolérantes.
- Leur principale caractéristique est un métabolisme exclusivement fermentaire qui les conduit à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (ethanol, CO<sub>2</sub>, autres acides organiques). Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites : homofermentaires ou hétérofermentaires.
- Leur capacité de biosynthèse est faible, elles possèdent de ce fait une exigence élevée en facteurs de croissance (acides aminés, bases nucléiques, vitamines).

Sept genres principaux constituent le groupe des bactéries lactiques : Lactobacillus, Carnobactérium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, pediococcus, leuconostoc.

Le genre Bifidobacterium est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme un genre de bactéries lactiques (Tableau 2). (PILET et al., 1998).

**Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques (PILET et al., 1998)**

<i>Genre</i>	<i>Morphologie</i>	<i>Fermentation</i>	<i>T° Opt.</i>	<i>Nbr esp</i>
Lactobacillus	Bacilles	Homofermentaires Ou Hétérofermentaires	Thermophiles Ou Mésophiles	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
Carnobacterium	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes	6
Lactococcus	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
Streptococcus	Coques	Homofermentaires	Mésophiles Ou Thermophiles	19
Enterococcus	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	13
Vagococcus	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	2
Pediococcus	Coques en tetrades	Homofermentaires	Mésophiles	7
Tetragenococcus	Coques en tetrades	Homofermentaires	Mésophiles	11
Leuconostoc	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	11
Oenococcus	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	1
Bifidobacterium	Forme irrégulière	Acide acétique et lactiques	Mésophiles	25

## II.2. Origine :

D'une manière générale, les bactéries lactiques peuvent être isolées du lait, des végétaux (NOVEL, 1993). Les espèces du genre Lactobacillus sont présentées en général dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'homme et les

animaux et participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme, aussi isolées dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés (PILET et al., 1998).

- Streptococcus thermophilus peut être isolé du lait chauffé à 45°-50°C ou du lait pasteurisé (NOVEL, 1993), des produits laitiers, yaourt, du matériel, de laiterie, des levains artisanaux, il n'aurait jamais été isolé d'autres habitats (NOVEL, 1993),.
- Les espèces du genre Lactobacillus isolées des produits végétaux (constituent leur réservoir principal), mais elles sont largement dans le lait et les produits laitiers. Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce (PILET et al., 1998), et possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre Vagococcus.
- L'habitat du genre Enterococcus est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produit végétaux sol, produit laitiers (PILET et al., 1998).

Les bactéries lactiques se trouvent généralement associés à d'autres micro-organismes dans de nombreux produits fermentés d'origine animal et végétale : laits fermentés (fromages, beurre), Viandes fermentées (Saucisson, viande faisandée), boissons alcoolisées à base de fruits (Cidre, bière), légumes et fruits fermentés ... (DEROISSART, 1986).

## II.3. Classification :

### II.3.1. Genre Lactobacillus :

KANDLER et WEISS, 1986 subdivisent le genre Lactobacillus en trois groupes selon leur type fermentaire :

Thermobacterium : Ce genre comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est à dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose, ce groupe est constitué d'environ 25 espèces la plus part thermophiles (croissance à 45°C ) dont Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus acidophilus et Lactobacillus helveticus.

Streptobacterium : Elles sont homofermentaires facultatives, la fermentation des hexoses est homofermentaires (mais peut être hétérofermentaires dans certains cas),

celle des pentoses et du gluconate et hétérofermentaires avec une production d'acide lactique et d'acide acétique.

**Betabacterium** : Ce groupe constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires. C'est à dire utilisent la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses, c'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme Lactobacillus brevis, Lactobacillus kefir et Lactobacillus sanfransisco. (Novel, 1993).

### **II.3.2. Genre Streptococcus :**

Trois principaux caractères des streptocoques sont utilisés pour leur classification : la capacité d'hémolyser les erythrocytes, la présence d'antigènes N polyosidiques spécifiques de groupe dans la paroi cellulaire et l'utilisation de réaction biochimique spécifique.

Une classification encore largement acceptée baser sur les testes sérologiques et biochimiques reconnaît quatre divisions principales : streptocoques pyogènes (habituellement  $\beta$ .hemolytiques), enterocoques (résistant à 6,5 % de NaCl), streptocoques lactiques (isolés des produits laitiers) et Streptocoques « viridans ».

Traditionnellement, les streptocoques lactiques mésophiles regroupent deux espèces Streptococcus lactis et Streptococcus cremoris, une sous espèce Streptococcus lactis subsp. diacetylactis se distingue de l'espèce type par la capacité d'utiliser le citrate et de produire du diacetyl (Novel, 1993) du fait des propriétés technologiques, Streptococcus thermophilus est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique et qui n'appartienne pas au groupe des streptocoques du groupe N (PILET et al., 1998).

## **II.4. Taxonomie :**

### **II.4.1. Caractères morphologique :**

Les bactéries lactiques ont deux formes bien distinguées :

- **Les coques** : C'est le cas de Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc et Pediococcus.
- **Les bacilles** : Cas de Lactobacillus, Carnobacterium. (NOVEL, 1993).

- Les coques sont des petites sphères plus au moins ovoïdes de 0,5 à 1,5 µm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades et des chaînes.
- Les bacilles sont de petits bâtonnets plus au moins allongés de 0,5 à 2 µm de diamètre et de 1,5 à environ 10 µm de long, se présentant en paires ou en chaînettes de longueur variable.

#### **II.4.2. Caractères physiologiques :**

La plus part des études physiologiques ont été réalisées surtout avec des bactéries lactiques isolées du lait ou des produits laitiers.

La différenciation entre espèces repose sur un certain nombre de caractères physiologiques :

- La nutrition azotée : L'utilisation des acides aminés, des peptides, des protéines du lait et éventuellement d'autres sources azotées.
- La fermentation des sucres.
- La production de composés antagonistes.
- La production d'arômes.
- La recherche de reductase et d'arginine dihydrolase.
- La détermination de température de croissance.
- L'action des minéraux sur le métabolisme (la tolérance au NaCl). (NOVEL, 1993).

Pour les Streptocoques, la capacité de lyser les hématies « *hémolyse* » t utilisée comme un des plus importants tests préemptifs d'identification, ainsi que leur température de croissance qui est comprise entre 20°C et 42°C avec un optimum de 35°C 37°C. Les streptocoques ont des exigences nutritives (HORAUD, 1982). D'autres tests d'identifier les streptocoques sont proposés par GUIRAUD et GALZY en 1980 et LEVEAU et BOUIX en 1980 :

- L'hydrolyse de l'amidon.
- La croissance à PH 9,6 et dans le lait au bleu de méthylène.
- Liquéfaction du gélatine.

Et pour les Lactobacilles, on peut rechercher :

- Les besoins en vitamines.
- Culture en présence de teepol.
- Hydrolyse de l'esculine.

La différenciation entre biotypes ou souches d'une même espèce s'appuie sur un ensemble des caractères tels que : les degrés de résistance aux inhibiteurs, bactériophages, antibiotiques, lactenines etc...., ainsi que les aptitudes acidifiantes, aromatisantes, protéolytiques, gazogènes, etc.... (DEROISSART, 1986).

#### ***II.4.3. Caractères structuraux :***

Le mode de différenciation évoqué ci-dessus fait appel à des techniques courantes de laboratoires de microbiologie. L'évolution des techniques d'investigation de la biologie cellulaire ouvre la voie à une taxonomie plus rigoureuse. Parmi ces techniques, l'étude de la composition de l'ADN qui permet de connaître l'homogénéité des espèces constituant ces germes : le pourcentage en bases G+C (GC %) de leur ADN montre une composition assez proche pour les genres Streptococcus (34-46 %), Leuconostoc (36-43 %) et Pediococcus (34-42 %). (NOVEL, 1993). Par contre, le genre Lactobacillus est caractérisé par l'hétérogénéité de ses espèces : 32-53 % (KANDLER et WEISS, 1986) et cette variabilité se trouve à l'intérieur même des subdivisions du genre, cette hétérogénéité laisse douter de la validité taxinomique de genre Lactobacillus ainsi que Streptococcus, c'est à dire entre les souches de même espèce (NOVEL, 1993 ; DEROISSART, 1986 ), grâce à cette technique les genres Streptococcus et Lactobacillus ont connu plusieurs réarrangements dans la nouvelle édition de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KANDLER et WEISS, 1986). Citons comme exemple les streptocoques du groupe sérologique N (Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Streptococcus lactis Var diacetylactis ) qui sont , maintenant, classés dans un nouveau genre Lactococcus. Ils sont considérés comme une variété d'une même espèce. Streptococcus thermophilus est considéré comme sous espèce de Streptococcus salivarius. Dans le genre Lactobacillus, le changement porte sur les espèces :

Lactobacillus lactis et Lactobacillus bulgaricus composant les levains et qui sont, maintenant, considérées comme des sous espèces de Lactobacillus delbrueckii.

#### II.4.4. Caractères biochimiques :

De nombreux tests biochimiques ont été décrits pour l'identification des bactéries lactiques (LEVEAU et BOUIX, 1980 ; HORAUD, 1982).

- Homo ou hétérofermentation.
- Hydrolyse de l'amidon, l'arginine, l'esculine et la gélatine.
- Croissance sur milieux hostils.
- Recherche de la citratase et de nitrate reductase.
- Fermentation des divers sucres.

**Tableau 3 : Résumé des évolutions taxonomiques de certains bactéries lactiques (ITG, 1989).**

<i>Genre</i>	<i>Ancienne appellation</i>	<i>Nouvelle appellation</i>
<u>Lactobacillus</u>		<u>Lb. helveticus</u> <u>Lb. iugurti</u>
		<u>Lb. delbrueckii</u> <u>Lb. leichmanii</u> <u>Lb. bulgaricus</u> <u>Lb. lactis</u>
		<u>Lb. helveticus</u>
		<u>Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii</u> <u>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</u> <u>Lb. delbrueckii subsp. lactis</u>
<u>Streptococcus</u>	Mésophiles (groupe N)	<u>St. cremoris</u> <u>St. lactis</u> <u>St. diacetylactis</u>
	Thermophiles	<u>St. thermophilus</u>
	Fécaux (groupe D)	<u>St. faecalis</u> <u>St. faecium</u>
		<u>Lactococcus lactis subsp. cremoris</u> <u>Lactococcus lactis subsp. lactis</u> <u>Lactococcus lactis subsp. lactis Var. diacetylactis</u> <u>St. salivarius subsp. thermophilus</u> <u>Enterococcus faecalis</u> <u>Enterococcus faecium</u>
<u>Leuconostoc</u>		<u>Leu. mesenteroides</u> <u>Leu. dextrancium</u> <u>Leu. cremoris</u> ou <u>Leu. citrovorum</u>
		<u>Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides</u> <u>Leu. mesenteroides subsp. dextrancium</u> <u>Leu. mesenteroides subsp. cremoris</u>

## II.5. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :

Le lait n'est pas un milieu de culture idéal pour les bactéries lactiques du fait de sa faible teneur en facteurs de croissance (vitamines azotés non protéiques ...), et de la présence de phages, souvent responsables d'accidents de fabrication. (PILET et al., 1998) mais avec une addition d'extrait de levure riche en vitamines au lait améliore la croissance bactérienne (DESMAZAUD, 1983).

### II.5.1. L'utilisation du Lactose :

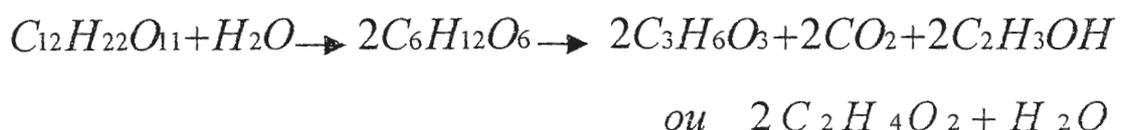
Le lactose est le sucre fermentescible du lait présent à des concentrations de l'ordre de 4 à 5 % (CHAMBA et PROST, 1996 ). Le métabolisme du lactose s'opère en trois phases :

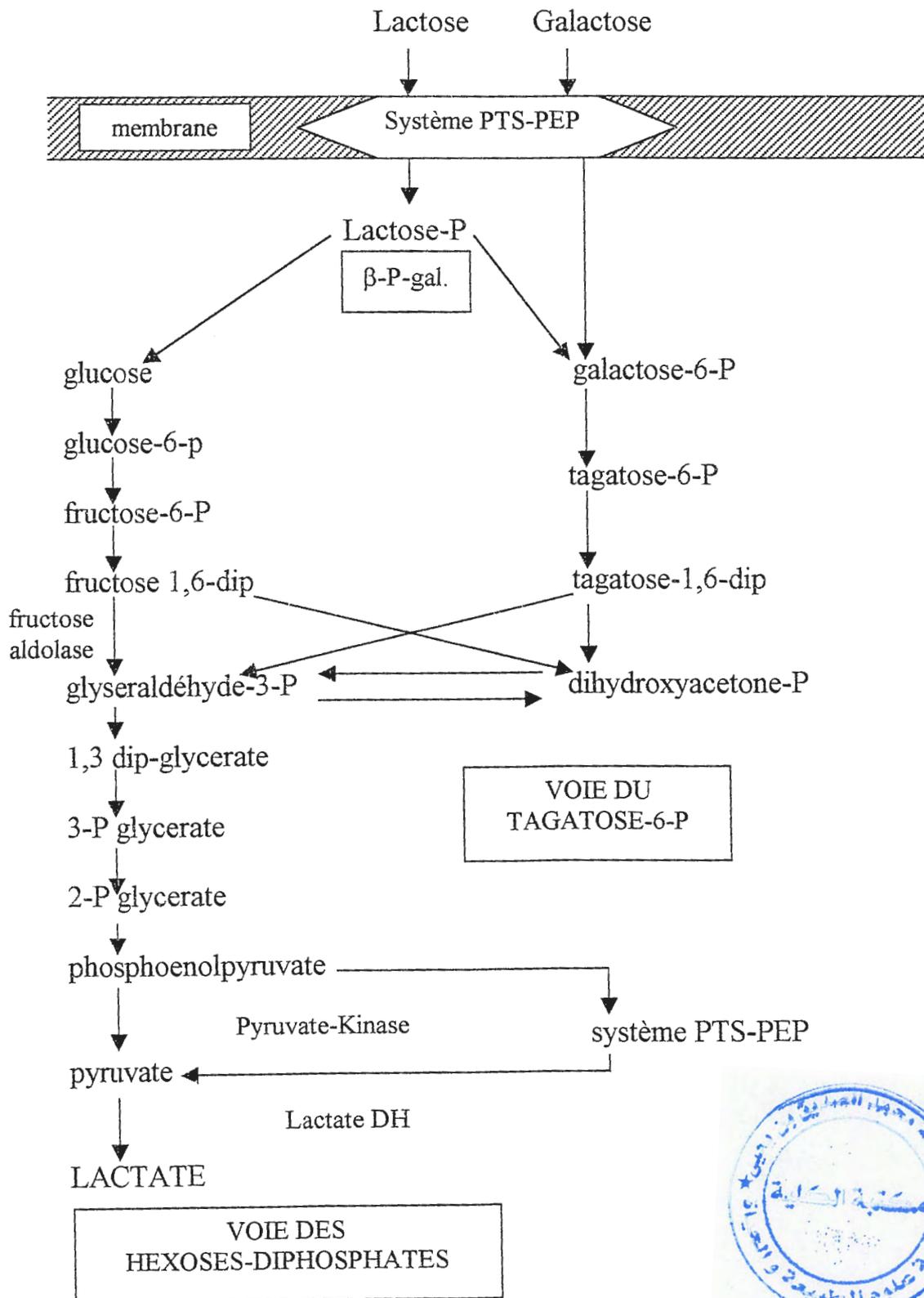
Le transport à travers la membrane, le clivage du disaccharide et ses composants et la dégradation des monosaccharides par des voies métaboliques différentes selon l'espèce bactérienne. (DEROISSART, 1986).

- Dans le métabolisme homolactique, le glucose est dégradé en lactate, en suivant directement la voie des hexoses diphosphates (voie de la glycolyse d'EMBDEN MEYERHOF) .Quand au galactose, il est d'abord dégradé par la voie du tagatose-6-P (figure 1) (DEROISSART, 1986).. Donc chaque mole de lactose produit ainsi 4 moles de lactate selon la réaction globale suivante :

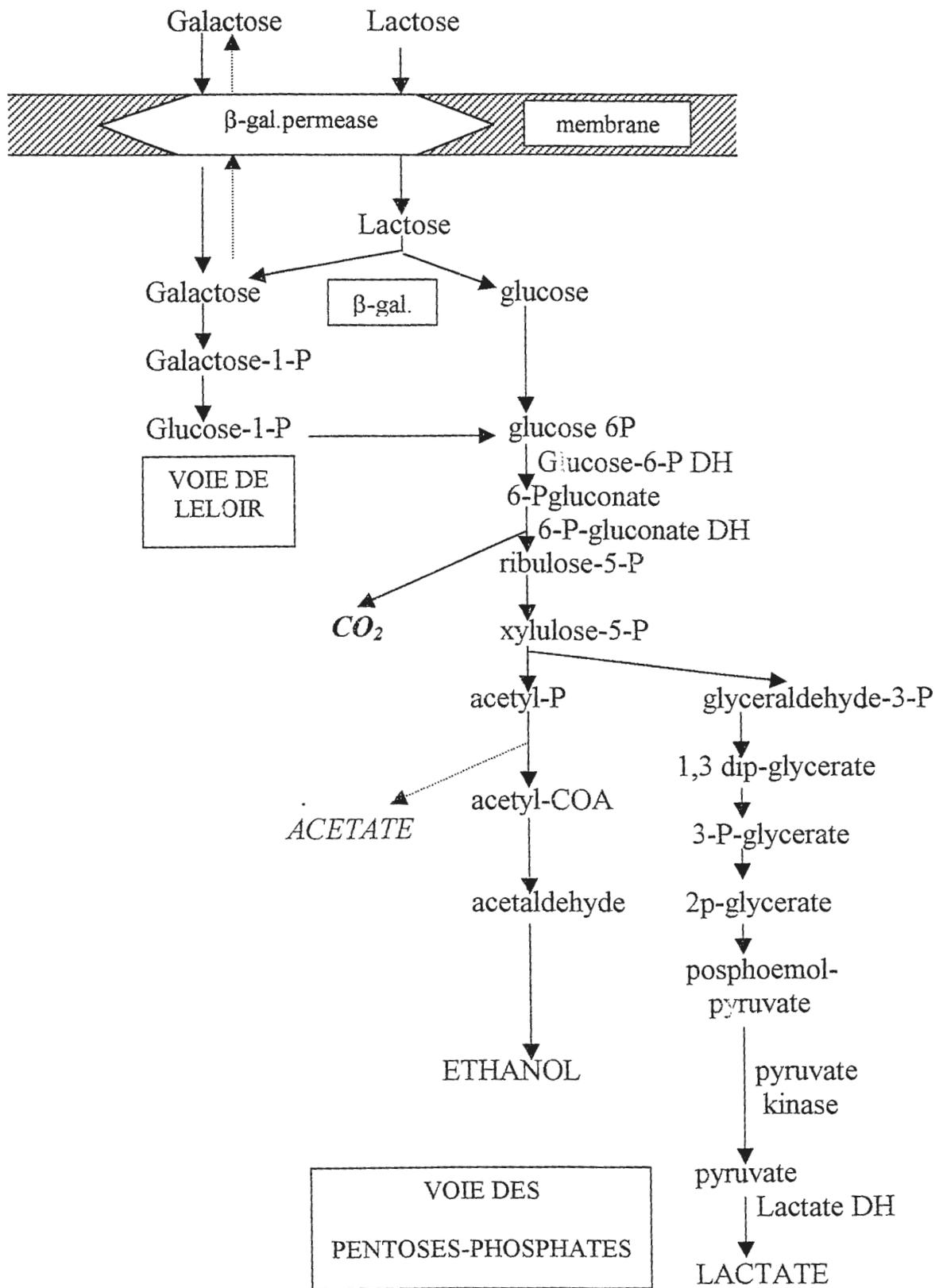


- Dans le métabolisme hétérolactique, le galactose est transformé en glucose-6-P en empruntant la voie de LELOIR qui sera dégradé en CO<sub>2</sub> et acétate ou éthanol par la voie des pentoses phosphates (Figure 2). Chaque mole de lactose produit ainsi 2 moles de lactate, 2 moles de CO<sub>2</sub> et 2 moles d'éthanol ou d'acétate, selon la réaction globale suivante (DEROISSART, 1986) :





**Figure 01 : Métabolisme homofermentaire du lactose et du galactose chez les bactéries lactique (DEROISSART, 1986).**



**Figure 02 : Métabolisme hétérofermentaire du lactose et du galactose chez les bactéries lactique (DEROISSART, 1986).**

Ainsi, la distinction entre homolactique et hétérolactique est basée sur les produits issus de la fermentation des sucres (Figure 3) à savoir :

- Chez les homofermentaires : 90 % de lactate.
- Chez les hétérofermentaires : 50 % de lactate.

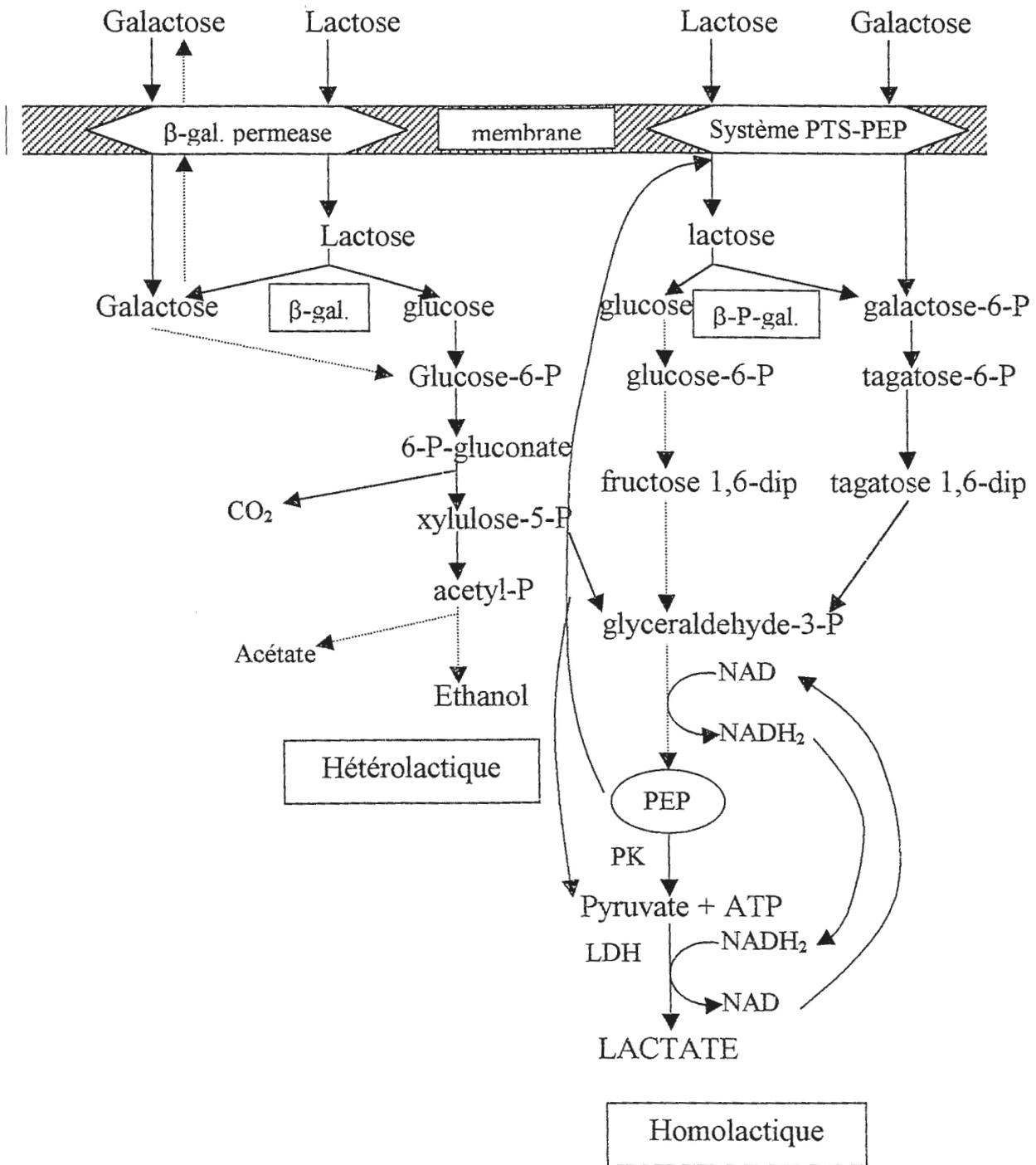
Le Tableau 4 résume les caractéristiques du métabolisme du lactose par les bactéries les plus utilisées en technologie laitière.

Les deux types de fermentation ont été différenciés par la présence chez les homolactiques d'une enzyme clé : la fructose-diphosphate-aldolase, il a été résulté de l'étude systématique des enzymes, une nouvelle division des bactéries lactiques, en trois groupes DOELLCE, 1981 cité par DEROISSART, 1986.

*-Homofermentaires obligés* : Possèdent les deux déhydrogénases, mais pas de fructose 1,6 P-aldolase, et de glucose-6-P-déhydrogénase ni 6-P-gluconate déhydrogénase et suivent la voie des hexoses diphosphates.

*-Hétérofermentaires obligés* : Possèdent les deux déhydrogénases, mais pas de fructose 1,6-P-aldolase et suivent la voie des pentoses phosphates.

*-Homofermentaires facultatifs* : sont dotés des trois enzymes et sont capables de suivre l'une ou l'autre des voies métaboliques (DEROISSART, 1986).



**Figure 03 : Pénétration et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques (DEROISSART, 1986).**

**Tableau 4 : Mécanisme de la fermentation du lactose**

**Par les bactéries lactiques (DEROISSART, 1986)**

<i>Espèce bactérienne</i>	<i>Système de transport du lactose</i>	<i>Enzyme de clivage du lactose</i>	<i>Déterminant génétique</i>	<i>Principale voie métabolique</i>	<i>Principaux produits de réaction</i>
<u>Streptococcus cremoris</u>	PTS-PEP	$\beta$ -P-gal $\pm$ $\beta$ -gal	Plasmide	Hexoses diphosphates	Lactate
<u>Streptococcus lactis</u>	PTS-PEP	$\beta$ -P-gal $\pm$ $\beta$ -gal	Plasmide	Hexoses diphosphates	Lactate
<u>Streptococcus diacetylactis</u>	PTS-PEP	$\beta$ -P-gal $\pm$ $\beta$ -gal	Plasmide	Hexoses diphosphates	Lactate Acetate, CO <sub>2</sub>
<u>Streptococcus thermophilus</u>	Permease	$\beta$ -gal	-	Hexoses diphosphates	Lactate
Lactobacillus homolactiques (a)	Permease ou PTS-PEP ou les deux	$\beta$ -P-gal $\pm$ $\beta$ -gal (b)	Plasmide dans certains espèce (c)	Hexoses diphosphates	Lactate

(a) : Lactobacillus bulgaricus , Lactobacillus lactis, Lactobacillus helveticus  
Lactobacillus casei.

(b) :  $\beta$ -gal seule présente chez Lactobacillus casei.

(c) : Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus casei.

### **II.5.2. Utilisation des peptides et des acides aminés :**

Les bactéries lactiques exigent des sources exogènes des acides aminés nécessaires à leur croissance, ces acides aminés ne sont pas en quantité suffisante dans le lait pour que les bactéries peuvent assurer la fermentation (SHARPE, 1978), les différents besoins sont représentés dans le tableau suivant (Tableau 5).

**Tableau 5 : Exigences en acides aminés des bactéries lactiques (HAMAMES, 1996).**

	<i>Acides aminés exigés</i>
Streptocoque de groupe N	Ils ont besoin au moins de Leu, Ile, Val, Met, Arg, His, Glu et pour certaines souches de Phe, Pro et Cys.
<u>Streptococcus thermophilus</u>	Les exigences portent essentiellement sur Glu, His, Cys, Met, Val, Leu et Tyr, les besoins en Glu et His sont les plus importants
<u>Lactobacillus helveticus</u> et <u>Lactobacillus salivarius</u> <u>Lactobacillus bulgaricus</u> <u>Lactobacillus lactis</u> et <u>Lactobacillus casei</u>	Glu, Ala et Pro  Ser, Thr
<u>Leuconostocs</u>	Ils sont stimulés par Glu, Met, ainsi que d'autres acides aminés variables selon l'espèce considérée.

Par marquage au C<sup>14</sup> des acides aminés libres du lait, MILLS et THOMAS, 1981 cités par NOVEL, 1993, ont montré que ces composés constituaient la source d'azote la plus rapidement incorporée dans les protéines cellulaires de Lactococcus lactis Subsp. Cremoris mais la croissance obtenue reste limitée : 5 % de la population cellulaire totale dans du lait pasteurisé HEAP et RICHARDSON, 1985 cités par NOVEL, 1993, et 25 % dans un lait autoclavé PEARCE et al., 1974 ; MILLS et THOMAS, 1981 cités par NOVEL, 1993.

L'utilisation des peptides libres du lait par les cellules des bactéries lactiques est une nécessité, puisque la concentration du lait en acides aminés libres ne peut

assurer la croissance de ces bactéries LAW, 1978 cités par NOVEL, 1993. En marquant la fraction azotée non protéique du lait, MILLS et THOMAS, 1981 cités par NOVEL, 1993 ont montré que seuls les peptides de PM < 1500, pouvaient servir de source d'acides aminés chez Lactococcus lactis subsp. lactis : Ces peptides sont en particulier une source de méthionine. Des résultats analogues ont été obtenus chez Streptococcus thermophilus : les peptides utilisés ont un PM de 1000 à 2500.

### ***II.5.3. Exigences vitaminiques :***

Les Streptocoques thermophiles ont une exigence absolue en acide Pantothénique et en Riboflavine et à un moindre degré en Thiamine, nicotiamide ou acide nicotinique et en biotine la pyridoxine ou ses dérivés stimulent fortement leur croissance GUSS et DELWICH, 1954 cités par HAMAMES, 1996. Les besoins vitaminiques des lactobacilles sont les suivants : toutes les espèces ont un besoin absolu en acide pantothénique et en niacine. La thiamine est toujours nécessaire pour la croissance des lactobacilles homofermentaires. Certaines souches ont besoin de l'acide folique, riboflavine, pyridoxal phosphate, biotine et vitamine B<sub>12</sub> (KANDLER et WISS, 1986).

Les streptocoques du groupe N exigent un certain nombre de vitamines : en particulier la niacine et l'acide pantothénique. La vitamine B<sub>6</sub> est stimulante, l'acide aminé alanine peut remplacer cette dernière chez certaines souches, l'acide folique ou folinique, la thiamine et la vitamine B<sub>12</sub> ne sont pas exigées RETTER et ORAM, 1962 cités par HAMAMES, 1996.

En conclusion, le lait contient toutes les vitamines exigées par les bactéries lactiques, en générale en concentration suffisante. Mais, des diminutions peuvent se produire selon la saison et le stade de la lactation ce qui peut diminuer la vitesse de croissance du levain RETTER et MÖLLER – MADSEN, 1963 cités par HAMAMES, 1996.

### ***II.5.4. L'influence des minéraux :***

Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques en minéraux sont mal connues : souligne la nécessité du Mn<sup>+2</sup> et/ou du Fe<sup>+2</sup> pour un bon milieu de croissance, la nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur

fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (NOVEL, 1993). Cependant, les ions  $Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$  et  $Se^{+4}$  peuvent intervenir dans la nutrition des streptocoques mésophiles RETTER et MOLLER – MADSEN, 1963 cité par HAMAMES, 1996, et les ions  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  et  $Fe^{+2}$  dans la nutrition des lactobacilles.

### **III. LES LEVAINS LACTIQUES ET LES PHÉNOMÈNES DE SYMBIOSE ET D'ANTIBIOSE :**

#### **III.1. Les levains lactiques :**

*III.1.1. Définition :* Les levains lactiques ou les ferments lactiques forment une source de bactéries pures et sélectionnées qui doivent être obligatoirement actifs et capables de se multiplier rapidement (ADJMI, 1978). Ils ont une grande importance dans l'industrie de transformation laitière (NOVEL, 1993).

#### *III.1.2. Les différents types de levain lactique :*

D'après NOVEL, 1993, les différents types des levains lactiques sont, selon leur composition en souches : des ferments à souche unique, des ferments multiples et des ferments mixtes.

*a. Les ferments multiples :* sont les mélanges des souches sélectionnées, compatibles et distinctes pour leur lysotype. Les souches sont cultivées indépendamment et mélangées peu avant leur commercialisation.

*b. Les ferments mixtes :* Sont des mélanges stables de composition (nombre et nature des souches) inconnues, les souches sont cultivées ensemble. NOVEL en 1993 montre aussi que les ferments commerciaux disponibles sont, selon les productions industrielles à réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles.

*Les ferments mésophiles :* ils sont constitués essentiellement de lactocoques (anciens streptocoques mésophiles), de certains Leuconostoc (Leu. cremoris, anciennement appelé Leu. citrovorum, Leu. dextrancium) et de certains Lactobacillus (Lb. casei, Lb. plantarum). Les bactéries sont classées en :

*Souches acidifiantes :* Lactococcus lactis subsp. Lactis et cremoris.

**Souches aromatisantes :** Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis et Leuconostoc. Ils sont utilisés en particulier, pour la fabrication des fromages frais et des fromages à pâte molle.

**Les ferments thermophiles :** ils comprennent l'espèce Streptococcus thermophilus et des Lactobacillus : Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus, Lb. lactis, Lb. helveticus et Lb. acidophilus et Lb. acidophilus.

Les levains thermophiles sont moins sensibles au PH que les mésophiles : Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus se développent dans le lait respectivement jusqu'à PH 4,1 et 3,8.

La température optimale de ces deux espèces étant voisine. Les ferments thermophiles sont souvent utilisés dans la fabrication du yaourt mais aussi dans d'autres lait fermentés : skys, koumiss etc ..., ils forment la flore des fromages à pâte cuite comme le fromage de type Suisse.

### **III.2. Phénomène de coopération ou symbiose :**

La croissance de certaines bactéries lactiques dans le lait a des effets de stimulation ou d'inhibition sur la croissance des autres souches ou espèces des bactéries lactiques (SHARPE, 1978), la coopération ou la stimulation est une interaction positive entre les souches. Elle peut être mise en évidence de plusieurs manières (HAMAMES, 1996). En général, la plus part des études concernant la symbiose des bactéries lactiques est celle entre Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus durant la fabrication du yaourt (SHARPE, 1978), les deux espèces se stimulent l'un de l'autre au cours de leur croissance symbiotique (HIGASHIO et al., 1977). Les Lactobacillus ont une grande activité protéolytique par rapport au Streptococcus, ce qui aide la croissance des Streptococcus thermophilus (SHARPE, 1978).

C'est depuis 1950, PETTE et LOLKEMA cité par HAMAMES, 1996 avaient mis en évidence cette stimulation : un simple comptage des bactéries indique que le nombre de cellules de Streptococcus thermophilus après 3 heures d'incubation à 45°C

est plus élevé dans le cas d'une culture mixte avec Lactobacillus bulgaricus que dans le cas de culture pure.

L'influence de Streptocoque sur le Lactobacille n'est pas bien déterminée, mais elle est considérée d'être due à la production d'acide formique par Streptococcus thermophilus (SHARPE, 1978). En général, la coopération entre souches intervient dans le cas des cultures mixtes du fait d'une espèce à une autre ou même d'une souche à une autre JUILARD et al., 1987, cité par HAMAMES, 1996.

D'après HIGASHIO et al., 1978, en culture sur lait, certains acides aminés produits par Lactobacillus bulgaricus ont stimulé la formation d'acide et la croissance de Streptococcus thermophilus, ces acides aminés ont été identifier comme étant valine, histidine, méthionine, acide glutamique et leucine.

La formation d'acide et la croissance de Streptococcus thermophilus dans le lait n'ont pas été stimulés par un seul de ces 5 acides aminés, mais remarquablement par leur mélange. Streptococcus thermophilus a produit aussi des substances stimulantes pour la formation d'acide et la croissance de Lactobacillus bulgaricus dans le lait, ces substances ont été identifier : ce sont l'acide formique et l'acide pyruvique, qui ont exercé un effet synergique. Ces phénomènes existent pour toutes les souches étudiées de Lactobacillus bulgaricus. Cependant la réussite de l'association dépend de la concentration des deux bactéries et des propriétés des souches elles mêmes (NOVEL, 1993)

### **III.3. Phénomène d'inhibition ou antibiose :**

Les substances inhibitrices produits par les bactéries lactiques conservent les produits laitiers en empêchant la croissance d'autres micro-organismes étrangers et pathogènes, les substances les plus importantes sont : l' $H_2O_2$ , l'acide lactique, les composés antagonistes (bactériocines), les antibiotiques et d'autres composés. (SHARPE, 1978).

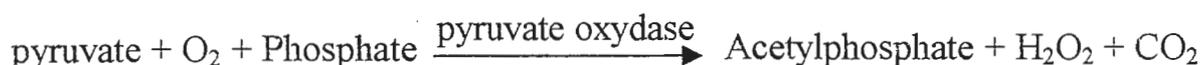
L'acide lactique, par exemple, inhibe la croissance des autres bactéries pathogènes tel que : Salmonella et Staphylococcus aureus et d'autres nombreux organismes (SHARPE, 1978). Le PH final de fermentation lactique dépend de la

matière première fermentée et des souches utilisées. Il est le plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yaourts, 4,8 pour les choucroutes, 4,6 à 5,3 dans le cas des saucissons, c'est à dire à des valeurs inférieures aux valeurs limites de développement de la plus part des flores d'altération et des flores pathogènes (PILET et al., 1998). Leuconostoc cremoris et Streptococcus diacetylactis aussi produisent l'acide acétique à partir de citrate qui est plus inhibitrice que l'acide lactique, surtout pour Pseudomonas, Salmonella et les coliformes (SHARPE, 1978).

L' $H_2O_2$  produit par les bactéries lactiques surtout les lactobacilles est un autre composé utilisé dans la conservation des aliments laitiers, en particulier. Il inhibe la croissance de Staphylococcus aureus, Proteus et surtout les Clostridia (SHARPE, 1978). Chez les streptocoques N cultivés en présence d'oxygène, l' $H_2O_2$  est produit par une NADH - oxydase, selon l'équation (HAMAMES, 1996).



Chez les lactobacilles, l'enzyme responsable de la production de  $H_2O_2$  est le pyruvate oxydase, suivant la réaction (DEROISSART, 1986).



L'effet des bactériocines : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches des bactéries lactiques. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif.

Les bactériocines des bactéries lactiques sont répartis selon leur composition chimique en 4 classes (PILET et al., 1998).

- ❖ La classe I regroupe les bactériocines possédant une structure peptidique particulière, dénomées lanthionines. C'est à cette classe qu'appartient la NISINE première bactériocine mise en évidence chez une souche de Lactococcus lactis. Le rôle de la nisine dans la protection des produits laitiers

est renforcé par le fait qu'elle possède une solubilité maximale aux PH acides rencontrés dans ces produits, elle est commercialisée comme additif alimentaire, utilisable dans les fromages fondus. Elle exerce ses effets inhibiteurs vis à vis de plusieurs autres bactéries lactiques mais également vis à vis de Listeria monocytogenes ou Clostridium tyrobutyricum.

- ❖ La classe II réunit des peptides de faible poids moléculaire à activités antimicrobiennes. Ils se caractérisent par leur activité commune vis à vis de Listeria monocytigenes, et une séquence N - terminale très conservée. Ils sont produit par divers genres de bactéries lactiques et exercent probablement des effets inhibiteurs dans les aliments où se trouvent les bactéries productrices.
- ❖ Les classes III et IV qui regroupent respectivement les bactériocines de haut poids moléculaire et les bactériocines possédant en plus de leur partie protéique une partie glucidique et lipidique.

#### **IV. LES LEVAINS LACTIQUES DANS LES PRODUITS LAITIERS :**

##### **IV.1. Utilisation des levains lactiques :**

###### ***a. Dans la fabrication du Yaourt :***

Selon la définition en 1977 par l'OMS, le yaourt ou yaghourt est le produit de la coagulation par « fermentation lactique acide due à Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus d'un lait ou lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec ...) avec ou sans additif. Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants (LEYRAL. et VIERLING, 1997), dont la quantité respective doit atteindre  $10^7$  cellules par gramme de produit. Les levains sont en général constitués de plusieurs souches de ces deux espèces, sélectionnés pour leur propriétés technologiques (PILET et al., 1998). Elles acidifient le lait par fermentation homolactique du lactose, l'acide lactique est donc le produit principal de la transformation. D'autres substances sont présentes : ethanol et acétone, qui jouent un rôle dans la qualité organoleptique du produit, la fermentation permet d'obtenir un gel par abaissement du PH et une saveur acide et aromatique (LARPENT et GOURGAUD, 1997 ; LEYRAL. et VIERLING, 1997).

Lactobacillus bulgaricus possède, en outre, une activité protéolytique et lipolytique modérée et transforme partiellement la caséine et les graisses du lait. Les produits d'hydrolyse de la caséine donnent au yaourt un goût de peptone. Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus sont des espèces symbiotiques : les acides aminés produits par l'hydrolyse de la caséine stimulent la croissance du streptocoque tandis que l'acidification engendrée, par son développement place Lactobacillus bulgaricus dans les conditions optimales de croissance.

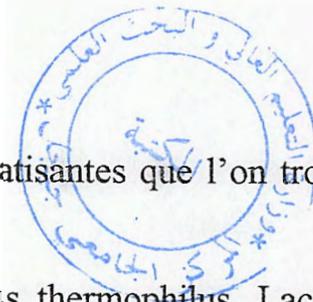
Aujourd'hui, le lait est pasteurisé et ensemencé avec les deux ferments spécifiques du yaourt (Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus). Ces ferments sont les descendants lointains de ceux de premier yaourt transmis par de multiples réensemencement. L'ensemble est chauffé à 45°C pendant quelques heures. A la fin de la fermentation commence la chaîne du froid, qui ne doit pas être rompue jusqu'à la consommation.

En fait, l'activité du produit et l'activité antibiotique des deux espèces microbiennes du yaourt suffisent à contrôler le développement de la plus part des micro-organismes contaminant. C'est pourquoi le yaourt était considéré comme une forme de conservation du lait. On retrouve que très rarement des micro-organismes pathogènes dans un yaourt.

#### ***b. Dans la fabrication du fromage :***

Les fromages résultent de transformations complexes du lait, par les micro-organismes. Ces derniers ont des différentes origines : le lait, l'atmosphère de locaux, le matériel utilisé, la saumure. Ils représentent une population d'environ  $10^6$  cellules par gramme (LEYRAL et VIERLING, 1997).

Les levains mésophiles constitués de Lactococcus et Leuconostoc participent à la fabrication des fromages frais, fromages à pâte molle, persillée ou pressée, les sous-espèces lactis et crémoris de Lactococcus lactis sont utilisés pour leurs propriétés acidifiantes. Les sous-espèces lactis biovar. diacetylactis et plusieurs



espèces du genre Leuconostoc, sont des souches aromatisantes que l'on trouve dans tous les types de fromages (PILET et al., 1998).

Les levains thermophiles associant Streptococcus thermophilus, Lactobacillus helveticus et Lactobacillus delbrueckii appartiennent à la flore des fromages à pâtes cuites (Gruyère) (PILET et al., 1998)).

Le tableau suivant représente les différentes utilisations des bactéries lactiques et leurs rôles.

**Tableau 6 : Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles. (PILET et al., 1998)**

Laits fermentés	Yaourt	<u>Lactobacillus delbrueckii</u> subsp. <u>bulgaricus</u> , <u>Streptococcus thermophilus</u>
		Acidification / texture / arômes (acétaldéhyde)
	Enrichis en bactéries	Idem yaourt + <u>Lactobacillus acidophilus</u> <u>Bifidobactérium</u> ou <u>Lactobacillus casei</u>
		Rôle nutritionnel
Lait ribot, buttermilk	<u>Lactococcus</u> , <u>Leuconostoc</u>	
	Texture / Arômes	
Kifir, Koumis	<u>Lactobacillus brevis</u> , <u>Leuconostoc</u> , <u>Lactococcus lactis</u>	
	Acidification / texture / arômes	
Beurre et crème		<u>Lactococcus lactis</u> biovar. <u>diacetylactis</u> Arômes diacetyl
fromages	frais ou à pâte molle	<u>Lactococcus lactis</u> subsp. <u>cremoris</u> , <u>lactis</u> , <u>diacetylactis</u> Acidification : formation du caillé
		<u>Leuconostoc</u> Formation d'ouvertures facilitant la croissance de <u>Penicillium</u>
	à pâte persillés	<u>Lactobacillus</u> , <u>Lactococcus</u> Arômes au cours de la maturation
		<u>Streptococcus thermophilus</u> , <u>Lactobacillus helveticus</u> , <u>Lactobacillus delbrueckii</u> subsp. <u>lactis</u> Acidification : production d'acide lactique utilisé par les bactéries propioniques / protéolyse
	à pâte pressée	<u>Streptococcus thermophilus</u> , <u>Lactobacillus helveticus</u> , <u>Lactobacillus delbrueckii</u> subsp. <u>lactis</u> Acidification : production d'acide lactique utilisé par les bactéries propioniques / protéolyse
		(gruyère, emmenthal.)

## **IV.2. Actions des bactéries lactiques dans les aliments :**

PILET et al., 1998 montrent que les bactéries lactiques ont deux rôles principaux dans les aliments liés à leurs activités métabolique (Tableau 7).

- Un rôle positif ou technologique : il s'exerce principalement dans les produits fermentés avec des conséquences sur l'ensemble des facteurs de qualité.
- Un rôle négatif : il se traduit essentiellement par l'altération des denrées concernées fermentées ou non fermentées.

### ***IV.2.1. Les propriétés technologiques :***

La plupart des produits obtenus par fermentation résultent des procédés traditionnels, dont l'objectif initial. était la conservation ou la valorisation des matières premières. La participation de la flore lactique aux caractéristiques organoleptiques, technologiques, nutritionnelles et sanitaires de ces produits s'exerce par différentes propriétés métaboliques.

#### ***a. Rôle sur la structure et la texture :***

La texture est le phénomène posant le plus de problèmes en fabrication compte-tenu de l'inexistence des capteurs fonctionnels permettant de l'apprécier (TERRE, 1986). Pour obtenir une consistance déterminée, dans le cas de yaourt, l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être combinée à celle des souches productrices de polysaccharides (PILET et al., 1998), cette consistance dépend de la teneur en protéines, donc, en extrait sec, elle dépend également de la matière grasse et de la nature des cultures employées.

En ce qui concerne les fromages, le rôle des bactéries lactiques est la formation d'un caillé dit « lactique » (PILET et al., 1998).

#### ***b. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques :***

En dehors de l'acide lactique et des autres acides organiques produits par fermentation qui confèrent aux produits leur caractère acide, les principaux composés impliqués sont le diacétyl et l'acétaldéhyde. Ils sont produits à partir du pyruvate, issu de la glycolyse, mais aussi du métabolisme du citrate (PILET et al., 1998).

#### ***c. Rôle sur la conservation :***

Ce rôle est lié aux propriétés d'inhibition des bactéries lactiques qui s'exercent de différentes manières : production d'acide, production des bactériocines et d'H<sub>2</sub>S etc.

**d. Rôle dans l'altération :**

C'est le rôle négatif appliqué sur la qualité des aliments du fait des altérations provoquées par la production d'acide, due à une acidification non contrôlée, par la production du gaz (CO<sub>2</sub>) et d'autres altérations, qui sont dues au métabolisme des bactéries lactiques dans plusieurs aliments. (PILET et al., 1998).

**Tableau 7 : Principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments (PILET et al., 1998)**

<i>Rôles positifs</i>	<i>Rôles négatifs</i>
- structure et texture <ul style="list-style-type: none"> <li>• acidification</li> </ul> laits fermentés, fromages	- altération de l'aspect <ul style="list-style-type: none"> <li>• polysaccharides</li> </ul> produit carnés, vin, bière
<ul style="list-style-type: none"> <li>• polysaccharides</li> </ul> laits fermentés	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CO<sub>2</sub></li> <li>• peroxyde d'hydrogène</li> </ul> produit carnés
- arômes et saveur <ul style="list-style-type: none"> <li>• acides organiques</li> </ul> tous produits fermentés	- altération des qualités organoleptiques <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidification trop poussée</li> </ul> lait cru, vin, produit carnés
<ul style="list-style-type: none"> <li>• diacetyl / acétaldéhyde beurre et crème / yaourt</li> <li>• Lipolyse</li> </ul> Saucisson, fromages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• oxydation des acides gras beurre et crème, produits carnés</li> <li>• protéolyse : peptides amers, fromages</li> </ul>
fromages	- production de composés toniques
- conservation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aminés (tyramine)</li> </ul> produits carnés
tous produits <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acides organiques</li> <li>• bactériocines</li> <li>• peroxyde d'hydrogène</li> </ul>	
- nutrition	
laits fermentés <ul style="list-style-type: none"> <li>• digestion du lactose</li> <li>• colonisation de l'intestin</li> </ul>	

# *PARTIE II*

***MATÉRIELS***

***ET MÉTHODES***

## ***I. MATÉRIELS :***

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du centre universitaire de Jijel : les appareils utilisés tout le long de notre travail sont :

- Agitateur magnétique (HEIDOLPH MR 3001).
- Autoclave.
- Bain-marie (GERHARDT).
- Balance analytique (KERN).
- Etuve (MEMMERT).
- Etuve pour stérilisation de la verrerie (CONTROLS).
- Microscope optique (OLYMPUS).
- PH mètre (BIOBLOCK).
- Réfrigérateur (ENIEM) pour la conservation.

## ***II. MÉTHODES :***

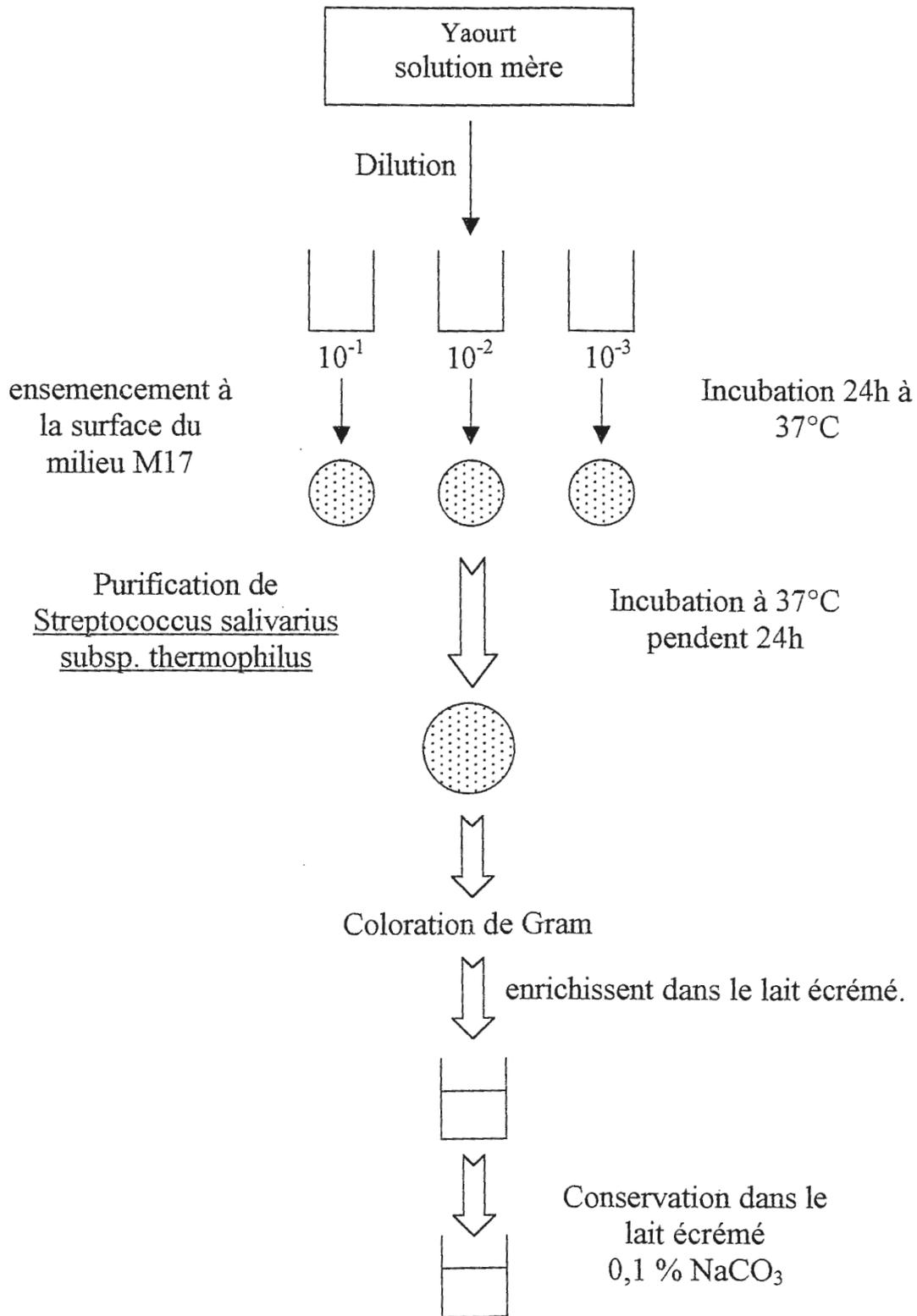
### **II.1. Technique d'isolement et de mesure du pouvoir acidifiant :**

#### ***II.1.1. Echantillonnage et technique de prélèvement :***

Nos essais ont porté sur deux échantillons de yaourt :

- Une boîte de yaourt Djurdjura achetée au marché le 20 Avril 2001.
- Une boîte de yaourt préparée dans notre laboratoire par un levain lyophilisé (Freeze- dried lactic culture for directe Vat Set lot no 2162803) .

***II.1.2. Méthodologie d'isolement :*** une fois au laboratoire l'échantillon du yaourt est mis au réfrigérateur avant de subir les différentes étapes de l'analyse (Figure 04).



***Figure 04 : Méthode d'isolement et de purification de Streptococcus salivarius subsp.thermophilus***

### **a. Milieux de cultures :**

Les deux milieux de culture utilisés au cours de l'isolement et la purification des souches, dont la composition se trouve en annexe, sont :

- Milieu M17 (TERZAGHAI et SANDINE, 1975) : milieu d'isolement des streptocoques lactiques.
- Lait écrémé : milieu pour enrichissement, constitué à 10% (p/v) par un lait écrémé (lait écrémé en poudre Spray).

### **b. Technique d'isolement, d'enrichissement, de purification et de conservation :**

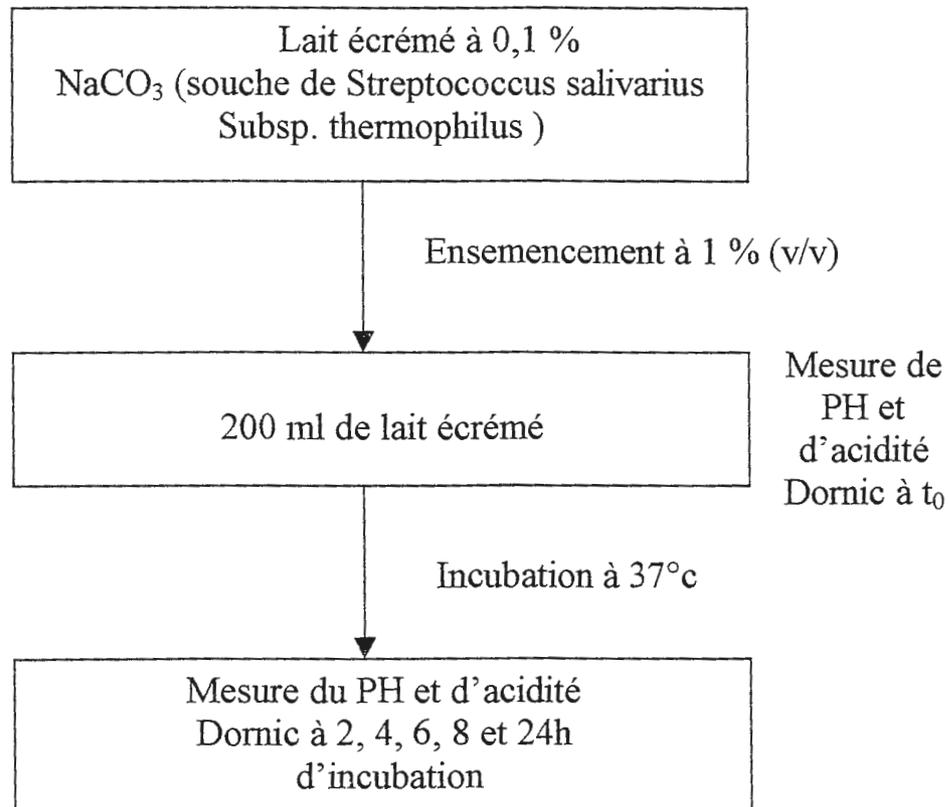
Les boîtes de Petri contenant le milieu de culture M17 préalablement coulées et séchées, sontensemencées à partir des dilutions préparées et placées à l'étuve à 37°C. Les boîtes sont lues après 24h d'incubation pour chaque échantillon de lait, l'observation des colonies présente la morphologie et la pigmentation proche a celle de Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus prélevées et repiquées une fois puis enrichies dans le lait écrémé. Le milieu d'enrichissement est examiné après 24h à 48h d'incubation par une coloration de Gram. Les souches pures Gram (+) sont conservées par la méthode de LATE et MUMDT en 1986 par réfrigération dans le lait écrémé contient 0,1 à 0,5% de NaCO<sub>3</sub>.

#### **II.2.1. Méthode de mesure du pouvoir acidifiant :**

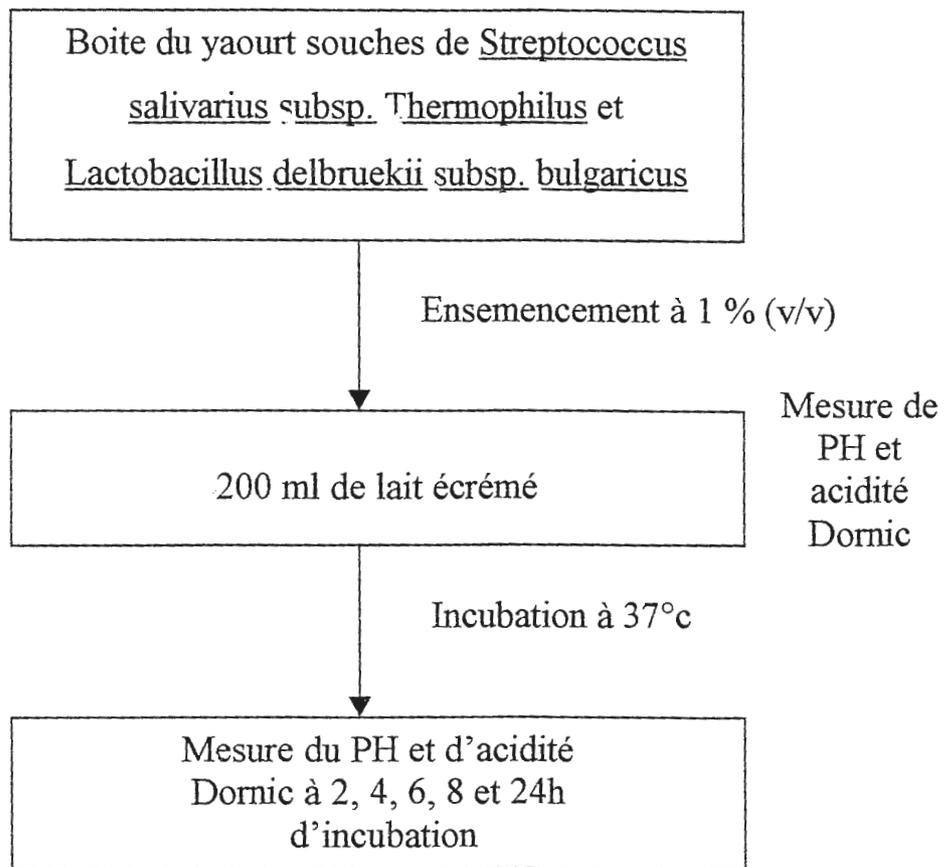
Deux lots de 20 ml de lait de référence, reconstitué (lait écrémé en poudre Spray) à 10 % (p/v) dans de l'eau stérilisée à 120°C pendant 10 minutes. Le premier lot est inoculé à partir d'une culture de la souche pure dans le lait écrémé et le deuxième à partir de la boîte de yaourt d'origine. Toutes les deux sont inoculées à 1% (v/v). L'incubation s'effectue à la température constante de 37°C dans l'étuve.

L'activité acidifiante est évaluée en mesurant le PH du milieuensemencé sur des aligots de 10 ml prélevés stérilement à 2h, 4h, 6h, 8h et 24h d'incubation à l'aide d'un PH mètre. L'évaluation de l'acidification est également suivie par mesure de l'acidité Dornic (1 degré Dornic est équivalent à 0,1 g d'acide lactique par Kg de produit fermenté). Cette mesure est effectuée selon la méthode décrite par ACCOLAS et al., 1977).

L'échantillon prélevé précédemment est placé dans un bêcher de 50 ml, 0,1 ml de phénolphtaleine à 1% dans l'alcool à 95°. La soude N/9 est ajoutée à l'aide d'une burette jusqu'au virage au rose de l'échantillon. Pour obtenir l'acidité réellement produite (acidité acquise), l'acidité titrable à  $t_0$  (juste après incubation) est soustraite aux valeurs de l'acidité ; mesurée au cours de la croissance. (figure 05 et 06)



***Figure 05 : Méthode de mesure du pouvoir acidifiant de la culture pure de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus***



***Figure 06 : Méthode de mesure du pouvoir acidifiant de la culture mixte de Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus***

# *PARTIE III*

## *RÉSULTATS ET DISCUSSION*

## **I. RÉSULTATS**

### **I.1. Résultats d'isolement :**

#### **I.1.1. Aspect des colonies :**

Au cours d'isolement deux souches de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus ont été isolées. Les colonies observées sur le milieu M17 sont rondes, lenticulaires, à contour régulier, de coloration blanche crème de petite ou moyenne taille.

#### **I.1.2. Coloration de Gram :**

La coloration de Gram est un test réalisé pour déterminer le type morphologique des souches. Elle permet de différencier les bactéries Gram (+) des bactéries Gram (-). Elle a été réalisée selon le protocole suivant :

- Placer la lame horizontalement sur un porte lame après fixation du frottis par la chaleur.
- Ajouter le violet de gentiane pendant une minute, rincer à l'eau.
- Ajouter du lugol pendant une minute, rincer à l'eau.
- Ajouter de l'alcool pendant 30 secondes, rincer à l'eau.
- Ajouter la fuchine pendant une minute, rincer à l'eau.
- Sécher la lame et observer au microscope (objectif × 100) avec l'huile de cèdre.

L'observation microscopique montre que les deux souches sont des coques Gram (+) isolées en paires ou en chaînettes. Les cellules se représentent sous forme sphérique de diamètre variable.

### **I.2. Résultats de mesure du pouvoir acidifiant :**

Les résultats de mesure du PH et de l'acidité Dornic, obtenues pour les cultures pures et les cultures mixtes sont présentées dans le tableau 8 et 9.

**Tableau 8 : Résultats de mesure du PH et de l'acidité Dornic de la culture pure (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) et de la culture mixte (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) du 1<sup>er</sup> échantillon (yaourt de Djurdjura).**

Temps (h)	0		2		4		6		8		24	
Type de culture \ PH et acidité	PH	D <sup>0</sup>										
Culture pure (St <sub>1</sub> )	7,01	18,6	6,91	22	6,74	26	6,07	42	5,37	64	5,10	95
Culture mixte (St <sub>1</sub> +Lb <sub>1</sub> )	7,01	18,6	6,95	24	6,65	33	5,79	50	4,91	74	3,88	108

**Tableau 9 : Résultats de mesure du PH et de l'acidité Dornic de la culture pure (*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*) et de la culture mixte (*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) du 2<sup>ème</sup> échantillon (yaourt for Direct Vat Set )**

Temps (h)	0		2		4		6		8		24	
Type de culture \ PH et acidité	PH	D <sup>0</sup>										
Culture pure (St <sub>2</sub> )	6,52	25	6,43	26	6,30	28	5,76	34	5,10	46	4,31	83
Culture mixte (St <sub>2</sub> + Lb <sub>2</sub> )	6,52	25	5,99	27	5,88	30	4,66	50	3,79	74	2,93	123

D'après les tableaux 8 et 9, on remarque qu'en général, les cultures mixtes de Streptococcus solivarius subsp. thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus acidifient le lait mieux que les souches pures de Streptococcus solivarius subsp. thermophilus.

Pour mieux discuter nos résultats on a jugé utile de les présenter sous forme de PH, et de vitesse d'acidification exprimées respectivement en unité PH en milligramme d'acide lactique produit par heure. Ils sont représentés sous forme d'histogramme en fonction des intervalles du temps (histogramme 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)

La vitesse d'acidification est exprimée par :

$$V = \frac{dx}{dt} = \frac{x_f - x_i}{t_f - t_i} \quad (mg/h)$$

dx : Variation de la production d'acide lactique.

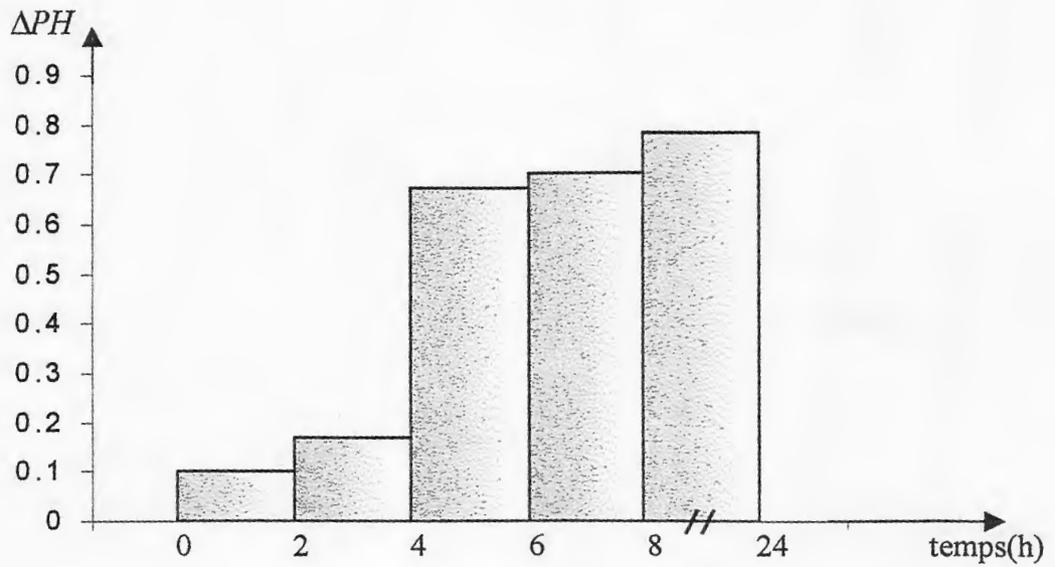
dt : Variation entre le temps final et le temps initial..

x<sub>f</sub> : Quantité finale d'acide lactique.

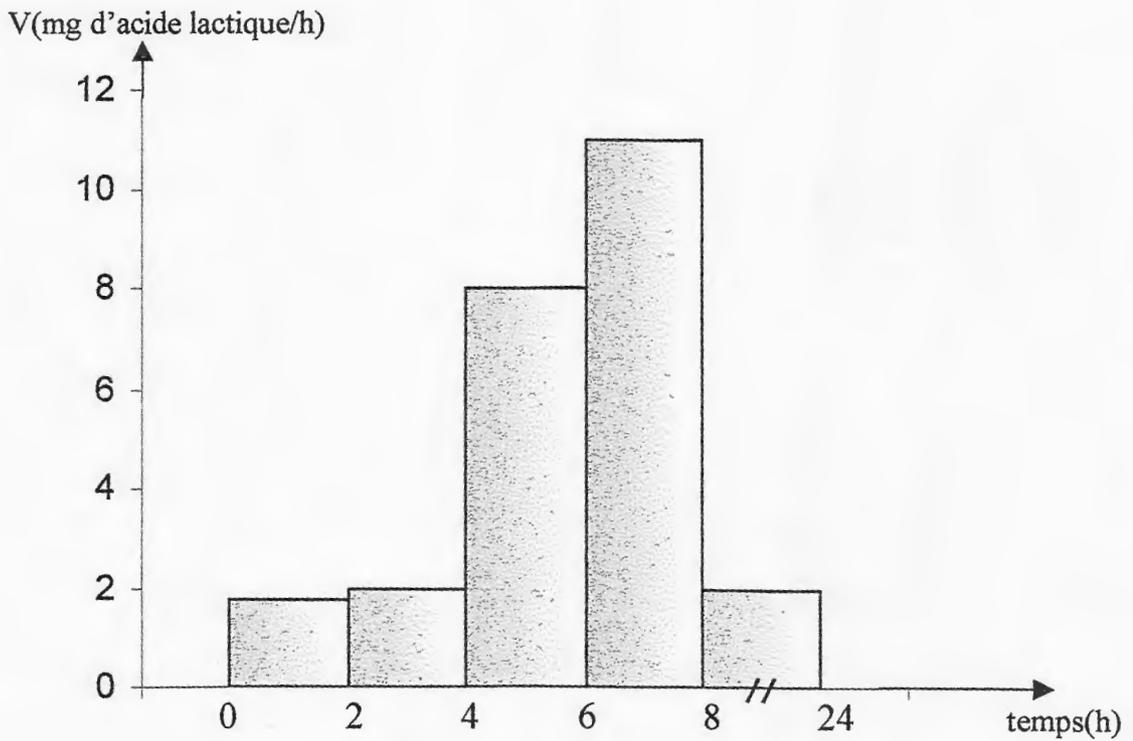
x<sub>i</sub> : Quantité initiale d'acide lactique.

t<sub>f</sub> : Temps final.

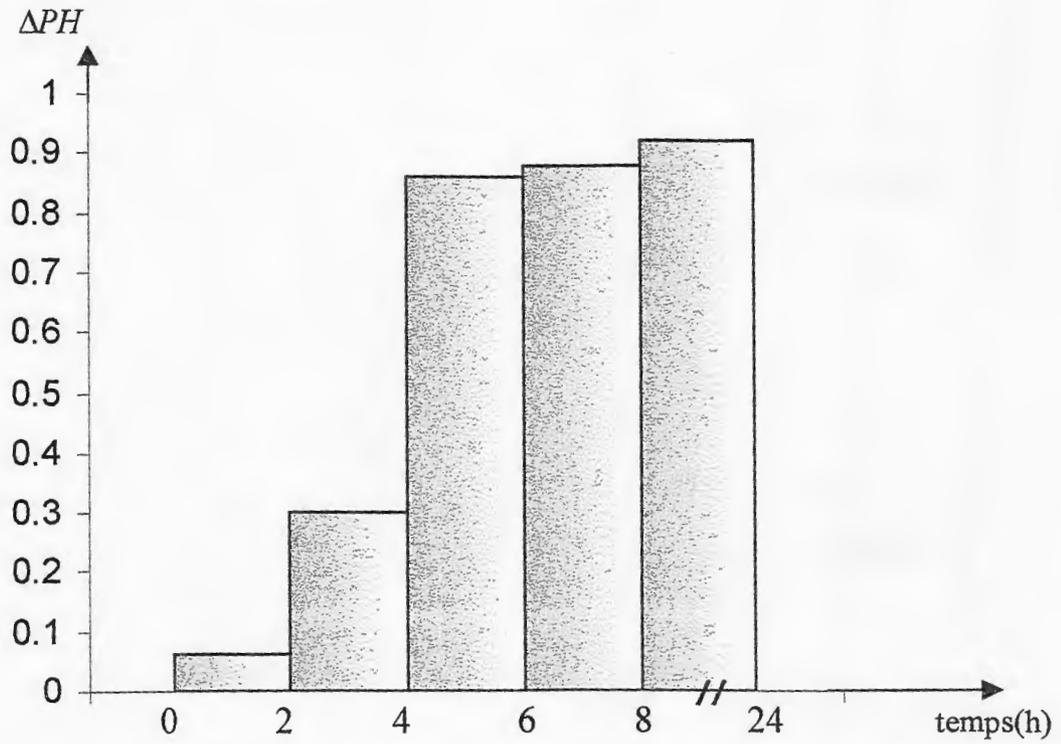
t<sub>i</sub> : Temps initial.



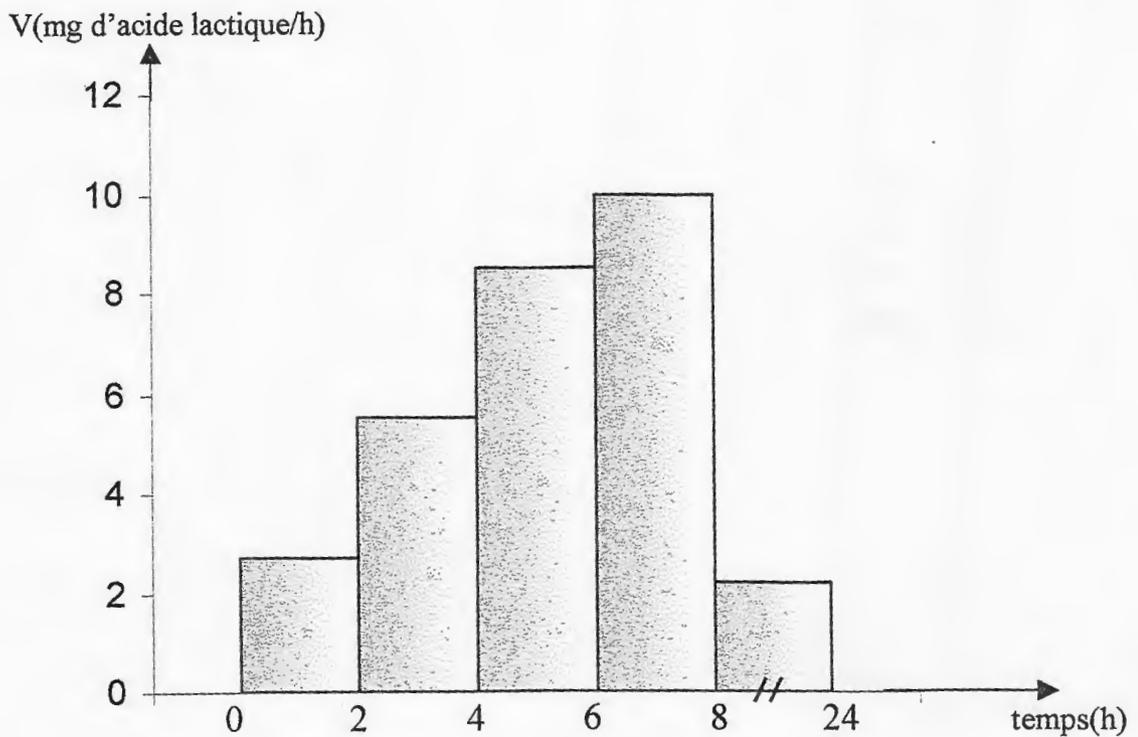
***Histogramme 1 : Variation de PH produite par la culture pure ( $St_1$ ) isolée du 1<sup>er</sup> échantillon au cours de croissance sur lait***



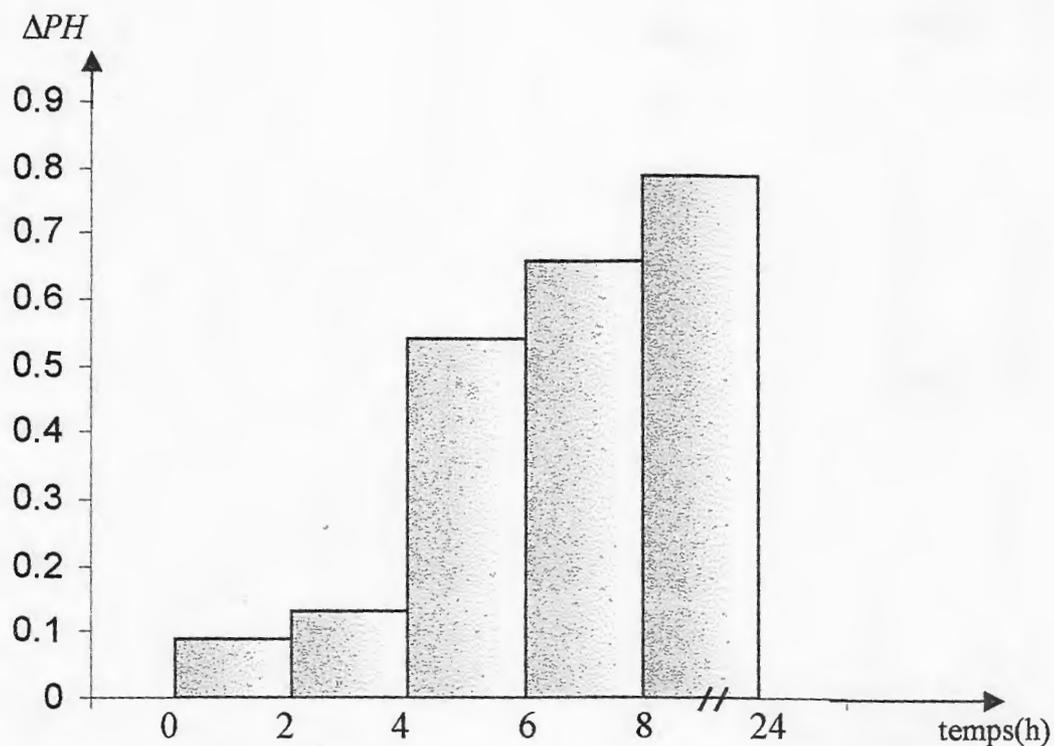
***Histogramme 2 : Vitesse d'acidification produite par la culture ( $St_1$ ) isolée du 1<sup>er</sup> échantillon au cours de croissance sur lait***



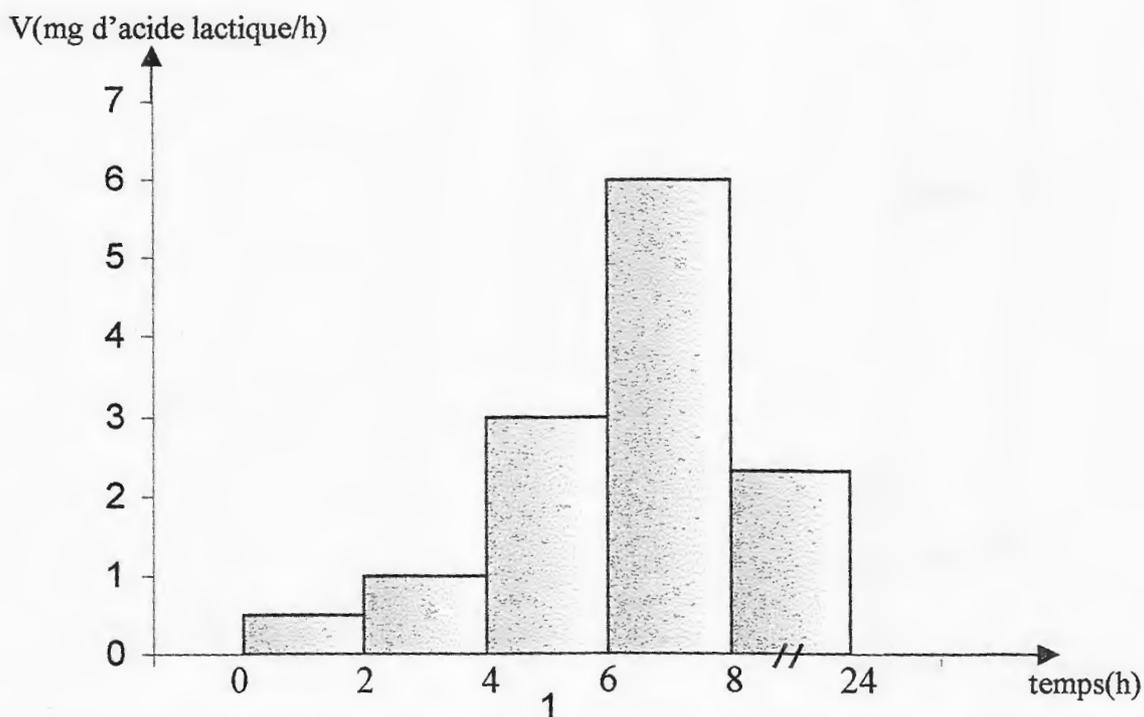
***Histogramme 3 : Variation de PH produite par la culture mixte ( $St_1 + Lb_1$ ) isolées du 1<sup>er</sup> échantillon au cours de croissance sur lait.***



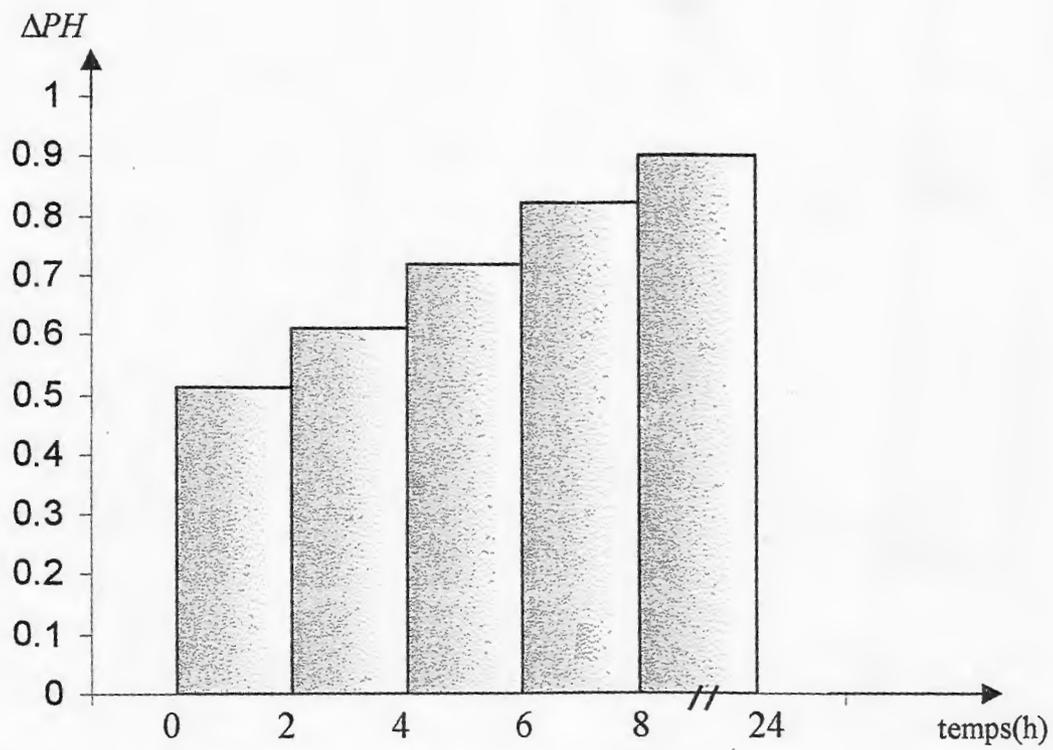
***Histogramme 4 : Vitesse d'acidification produite par la culture mixte ( $St_1 + Lb_1$ ) isolées du 1<sup>er</sup> échantillon au cours de croissance sur lait***



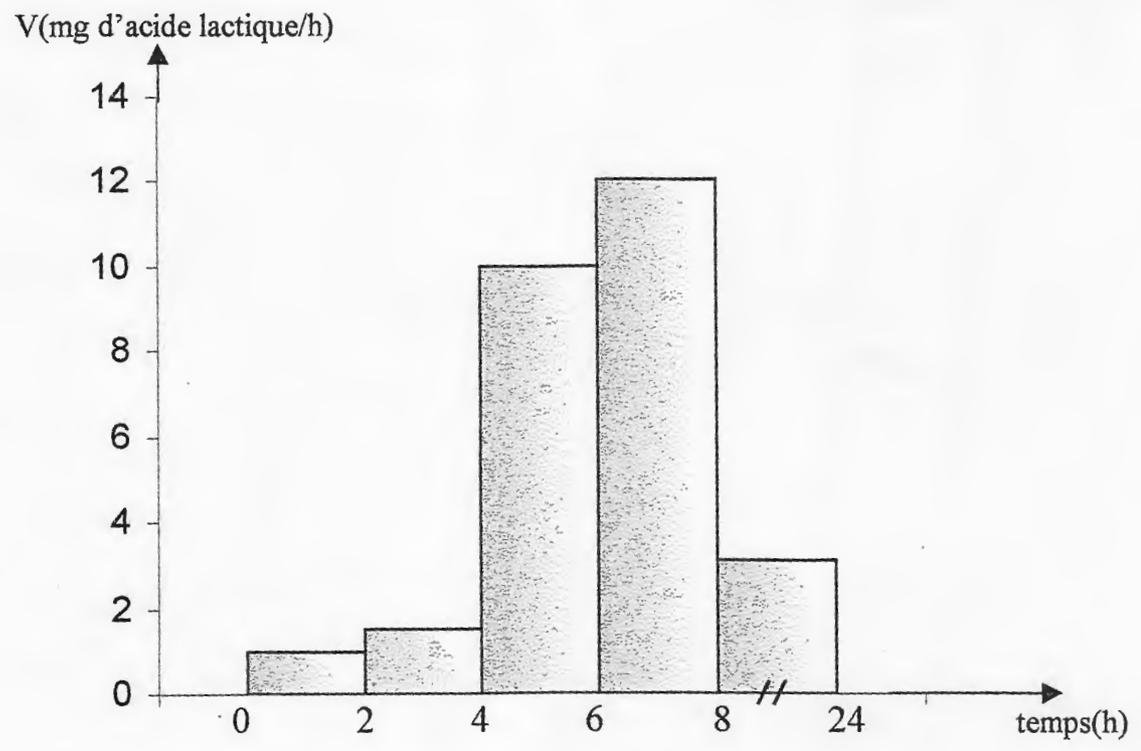
***Histogramme 5 : Variation de PH produite par la culture ( $St_2$ ) isolée du 2<sup>ème</sup> échantillon au cours de croissance sur lait.***



***Histogramme 6 : Vitesse d'acidification produite par la culture pure ( $St_2$ ) isolées du 2<sup>ème</sup> échantillon au cours de croissance sur lait***



***Histogramme 7 : Variation de PH produite par la culture mixte ( $St_2 + Lb_2$ ) isolée du 2<sup>ème</sup> échantillon au cours de croissance sur lait.***



***Histogramme 8 : Vitesse d'acidification produite par la culture mixte ( $St_2 + Lb_2$ ) isolées du 2<sup>ème</sup> échantillon au cours de croissance sur lait.***

## ***II. DISCUSSION***

Le premier rôle des bactéries lactiques étant d'acidifier le lait. Leur activité acidifiante est un important critère de sélection (CHAMBA et PROST, 1989). De nombreux paramètres interviennent dans l'estimation des propriétés acidifiantes des bactéries lactiques, par exemple la température d'incubation, le lait utilisé et surtout son traitement thermique, l'état physiologique des cellules de l'inoculum et leur concentration (ACCOLAS et al., 1977).

Dans notre cas et vu le manque de moyen, la température d'incubation est 37°C contrairement à celle utilisée dans la fabrication de yaourt qui est de l'ordre de 42°C. La concentration du lait en matière sec et son traitement thermique diffèrent complètement à celle utilisée dans l'industrie du yaourt. Cela peut être expliqué par le but de notre travail qui ne vise pas la production d'un bon yaourt possédant des caractères organoleptiques exceptionnels, mais la confirmation de l'interaction positive existant entre Streptococcus salivarius subsp. thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. En effet l'étude de l'association entre ces deux espèces a fait l'objet de plusieurs travaux (HIGHASHIO et al., 1977 ; HEMME et al., 1979).

La représentation graphique des variations du PH et des vitesses d'acidification montre qu'en général, la diminution du PH entre 0 et 4h d'incubation ainsi que la vitesse d'acidification sont presque les mêmes pour les deux types de cultures (pure et mixte).

Au delà de 4h, on remarque que, les cultures mixtes produisent plus d'acide lactique que les cultures pures pour les deux échantillons. Cela confirme les travaux de HEMME et al. (1981) sur l'étude de l'effet stimulant d'extrait de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus sur la production d'acide par Streptococcus salivarius subsp. thermophilus. Ces auteurs ont montré qu'il y a une diminution plus rapide du PH de milieu de culture après un temps donné d'incubation lorsqu'ils ajoutaient ces extraits. SHAMBA et al., (1991) confirment cette observation et rapportent aussi que ces extraits de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus contiennent des protéases.

Enfin, il faut signaler que les souches de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus n'ont pas été isolées à cause du manque du milieu culture spécifique, pour cela on a utilisé le yaourt directement.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail est la confirmation d'interaction positive entre les deux espèces (Streptococcus salivarius subsp. thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus) utilisées pour la fabrication du yaourt.

L'objectif assigné a été atteint par l'isolement de deux souches de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus. Les souches de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus n'ont pas été isolées à cause du manque de milieu spécifique (milieu de MAN, ROGOSA et SHARP).

La représentation graphique des variations du PH et des vitesses d'acidification ont montré que les deux types de cultures suivent les mêmes cinétiques d'acidification entre 0 et 4h d'incubation. Au delà les cultures mixtes produisent peu d'acide que les cultures pures.

Enfin, le travail de la confirmation de l'interaction positive entre les deux espèces utilisées pour la fabrication du yaourt ne se limite, probablement pas à l'étude de pouvoir acidifiant, mais à d'autres études peu approfondies des propriétés technologiques.

Pour cela, les perspectives que nous proposons sont :

- Tester leur resistance aux inhibiteurs tels que : les antibiotiques, les agglutinines, les bactériophages, etc ...
- Etude du pouvoir aromatisant.
- Etude du pouvoir protéolytique.

# *ANNEXES*

**I. Milieux de culture :**

**1. Milieu de TERZZAGHAI et SANDINE (M17 Agar, Institut Pasteur Alger) :**

**- Composition en g/l :**

Peptone trypsique de caseine -----	2,5
Peptone pepsique de viande -----	2,5
Peptone papainique de soja -----	5,0
Extrait de levure -----	2,5
Extrait de viande -----	2,5
Lactose -----	5,0
Acide ascorbique -----	0,5
β- Glycerophosphate de Na -----	19,0
Sulfate de magnésium -----	0,25
Agar -----	15,0
Eau -----	qsp 1000 ml

- Ajuster le PH  $7,2 \pm 0,1$
- Stériliser à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes.

**2. Lait écrémé en solution :**

Lait écrémé -----	100 g
Eau distillée -----	qsp 1000 ml.
Stériliser à $110^{\circ}\text{C}$ pendant 10 mn.	

**Tableau 10 : Les variations du PH et les vitesses d'acidification de la culture pure (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*) et la culture mixte (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) du 1<sup>er</sup> échantillon (yaourt de Djurdjura).**

Temps(h)	0 - 2		2 - 4		4 - 6		6 - 8		8 - 24	
Variation du PH et vitesse d'acidification	$\Delta PH$	Vmg/h								
Type de culture										
Culture pure (St <sub>1</sub> )	0,10	1,75	0,17	2	0,67	8	0,70	11	0,78	1,93
Culture mixte (St <sub>1</sub> + Lb <sub>1</sub> )	0,06	2,7	0,30	5,5	0,86	8,5	0,88	10	0,92	2,18

## I. Milieux de culture :

### 1. Milieu de TERZZAGHAI et SANDINE (M17 Agar, Institut Pasteur Alger) :

#### - Composition en g/l :

Peptone tryptique de caseine -----	2,5
Peptone pepsique de viande -----	2,5
Peptone papainique de soja -----	5,0
Extrait de levure -----	2,5
Extrait de viande -----	2,5
Lactose -----	5,0
Acide ascorbique -----	0,5
$\beta$ - Glycerophosphate de Na -----	19,0
Sulfate de magnésium -----	0,25
Agar -----	15,0
Eau -----	qsp 1000 ml

- Ajuster le PH  $7,2 \pm 0,1$
- Stériliser à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes.

### 2. Lait écrémé en solution :

Lait écrémé -----	100 g
Eau distillée -----	qsp 1000 ml.
Stériliser à $110^{\circ}\text{C}$ pendant 10 mn.	

**Tableau 10 : Les variations du PH et les vitesses d'acidification de la culture pure (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*) et la culture mixte (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) du 1<sup>er</sup> échantillon (yaourt de Djurdjura).**

Temps(h)	0 - 2		2 - 4		4 - 6		6 - 8		8 - 24	
	$\Delta\text{PH}$	Vmg/h								
Variation du PH et vitesse d'acidification										
Type de culture										
Culture pure (St <sub>1</sub> )	0,10	1,75	0,17	2	0,67	8	0,70	11	0,78	1,93
Culture mixte (St <sub>1</sub> + Lb <sub>1</sub> )	0,06	2,7	0,30	5,5	0,86	8,5	0,88	10	0,92	2,18

**Tableau 11 : Les variations du PH et les vitesses d'acidification de la culture pure (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) et la culture mixte (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) du 2<sup>ème</sup> échantillon (yaourt préparé dans notre laboratoire)**

Temps(h)	0 - 2		2 - 4		4 - 6		6 - 8		8 - 24	
Variation du PH et vitesse d'acidification	$\Delta PH$	Vmg/h								
Type de culture										
Culture pure (St <sub>2</sub> )	0,09	0,5	0,13	1	0,54	3	0,66	6	0,79	2,31
Culture mixte (St <sub>2</sub> + Lb <sub>2</sub> )	0,53	1	0,61	1,5	0,72	10	0,83	12	0,90	3,06

- 11- HORAUD I.,1982:les bactéries Gram positif .In–Bactériologie médicale par LE MINOR L. et VERON H. 1<sup>ère</sup> édition . P ( 529,531,532).
- 12- Institut technique de Gryer , 1989 : Protocole d'identification des bactéries lactiques.
- 13- KANDLER O.,WEISS N. , 1986:Genus Lactobacillus.In- Bergey's Mannual of Systématique Bactériology par SNEATHPH A ., MAIR N., SHARPE M .E., 14-HOLT J.G.Ed ., WILLIAMS and WILKINS , Baltimore , vol 2 , 12009-1234 .
- 14- LARPENT J.P., 1987 : Microorganismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages , leur rôle sur les propriétés organoleptiques .In-Biotechnologie et industries laitières .Apria ,Paris. 45-80.
- 15- LARPENT J.P., 1996 : Les bactéries lactiques .In- Microbiologie alimentaire par BOURGEOIS C.M . et LARPENT J .P. tome 2 Ed.technique et documentation Lavoisier. P (4,16).
- 16- LARPENT J.P., LARPENT– GOURGAUD M., 1997 : Les micro -organismes utiles .In-Memento technique de microbiologie . 3<sup>ème</sup> édition. P 772.
- 17- LECLERC H., GAILLARD J.L., SIMONET M. , 1995 : Les grandes groupes de bactéries , bactéries à Gram +, non sporulées .In-Microbiologie générale. Doin éditeurs .Paris . P (440,444).
- 18- LEYRAL G., ELISABETH V., 1997: Microbiologie et toxicologie des aliments , Hygiène et sécurité alimentaire .2<sup>ème</sup> édition .P 93.
- 19- NOVEL G .,1993 : Les bactéries lactiques .In-Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel par LEVEAU J.Y. et BOUIX M.Ed ., technique et documentation Lavoisier 612 P .
- 20- PILET M.F., MAGRAS .C., FEDERIGHI M., 1998 : Les bactéries lactiques .In biotechnologie alimentaire par SUTRA L.,FEDERIGHI M., JOUVE J.L. Ed. Poy technica . 308 P.
- 21- SHARPE E ., 1978 : Lactic acid bacteria in the dairy industry.J.Soc.Dairy technol , vol 32 , 9-17.

22- TERRE S.,1986: Propriétés technologiques nutritionnelles et physiologiques de Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus. Tech.Laitière et marketing ,1008,26-31.

Réalisé par : -BOULAICHE Djamila

Date de soutenance : 07-10-2001

-SEBTI Nadjet

Diplôme D'études Supérieures(DES) . Option : Microbiologie

ملخص :

تم عزل سلالتين من نوع Streptococcus salivarius subsp. thermophilus من عيتين مختلفتين من الياوورت . السلالتين تم مقارنتهما مع عينة مأخوذة مباشرة من علبه ياوورت تحتوي على نوع Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgarius . تغيرات الحموضة المسجلة تختلف بين المزارع النقية والمزارع المختلطة : وتغيرات pH وسرعة الحموضة بين زمن 0 و 4 سا من التحضين هي نفسها لكلا المزرعتين . ابتداء من زمن 4 سا ، المزارع المختلطة هي الأكثر حامضية.

Résumé :

Deux souches de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus ont été isolées de deux échantillons du yaourt. Les deux souches ont été comparées avec un inoculum prélevé directement du yaourt est qui contient l'espèce Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus . les cinétiques d'acidification ont montré deux comportements différents . les cultures pures et les cultures mixtes présentent les mêmes variations du PH ainsi que les mêmes vitesse d'acidification entre 0 et 4h d'incubation. Au-delà de 4h, les cultures mixtes sont les plus acidifiantes.

Sammary:

Two stumps of Streptococcus salivarius subsp. thermophilus have been isolated of two samples of yogurt. These two stumps have been compared with an inoculum appropriated directly of yogurt is that contains space Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus . The kinetic of acidification showed two different behaviors . the pure cultures and cultures mixed show the same variations of PH as well as the same speeds of acidification between 0 and 4h of incubation . beyond 4h , the mixed cultures are the more acidifianteses.

Mots Clés :

Bactérie Lactique – Acidification – Symbiose - Yaourt

Résponsable de Recherche : Mr HAMAMES Nouredinne