République algérienne démocratique et populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Centre universitaire de Jijel
المركز الجامعي عبد الحق بن حمودة – جيجل –
Institut des sciences de la nature
معهد العلوم الطبيعية

003/2002
01/02

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme
d'étude supérieure en biologie
Option : Microbiologie

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المكتبة
المركز الجامعي جيجل

Thème

Isolement, purification, caractérisation et pré-identification de bactéries lactiques de lait cru (région de Jijel)

Encadreur :
-IDOUI Tayeb

Réalisé par :
-BENDAS Sabrina
-MAOUCHE Samia
-NACER Radia

Promotion 2002

N° d'ordre :

Remerciements

Nous remercions Dieu qui nous a donné du courage et de la volonté d'avoir réussit dans

notre vie éducationnelle et privée.

Nous remercions particulièrement notre encadreur monsieur: Idoui Tayeb, d'avoir accepter
de diriger notre travail, pour ses précieux conseils et ses encouragements qui nous nous
avions besoins.

Nos remerciements s'adressent également tous les enseignants de la biologie de l'université
de Jijel.

Nous remercions aussi les techniciens de laboratoire d'université surtout: Nadjiba et Sounia.

En fin, nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aide de prés ou de loin.

Sabrina, Radia, Samia

ERRATUM

Page	Lire	Au lieu de
2	entner	enter
5	parmis	permis
6	lactocoques	Lactocoques
6	streptocoques	Streptocoques
6	lactobacilles	Lactobacilles
6	leuconostoc	Leuconostoc
9	pediocoques	Prdiocoques
9	lactobacilles	lactabacilles
10	lactocoques	Lactocoques
10	Gram	GRAM
12	lactobacilles	Lactobacilles
12	streptocoques	Streptocoques
12	leuconostoc	Leuconostoc
12	pediocoques	Pediocoques
15	streptocoques	Streptocoques
15	colonie	Colonie
16	due	du
16	jaune	Jaune
17	lactique	Lactique
17	lecture	Lecture
18	coques	Coques
18	bleu	Bleu
18	Gram	GRAM
26	*Lactobacillus* (I)	*Lactocillus*
26	*Lactobacillus* sp 01 (I)	*Lactococcus* sp 01

c-3- Test physiologiques et biochimiques 15
- Recherche de catalase 15
- Test de la croissance à différents températures 15
- Test de croissance en milieux hostiles 15
  - Lait de CHERMAN 15
  - Le bouillon hypersalé 15
- Recherche de l'Argenine dihydrolase (ADH) 16
- Production de polysaccharides 16
- Recherche de type fermentaire 16

II-2-2 – Etudes de quelques propriétés technologiques 16
a- Etude du pouvoir acidifiant 16
b- Recherche de l'activité protéolytiques 17
c- Production d'exopolysaccharides 17
II-2-3 – Les interactions bactériennes 17

Troisième Partie : Résultats et discussion

III-1- **Isolement, purification et préidentification des bactéries lactiques** 18
- Examen macroscopiques 18
- Examen microscopiques 18
- Tests physiologiques et biochimiques 18

III-2- **Aptitudes technologiques** 20
III-2-1- Pouvoir acidifiant 20
III-2-2- Activité protéolytique 20
III-2-3- Production d'exopolysaccharides 26
III-3- **Interactions bactériennes** 26

Conclusion général 29

Annexes.

Bibliographie

Première Partie

Analyse Bibliographique

Introduction :

De très nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation ,ce qui leur assure des caractéristiques bien particulières d'arôme et de texture. Les bactéries qui en sont responsables sont toutes regroupées sous la même appellation de bactéries lactiques (**Desmazeaud, 1996**).

Les bactéries lactiques ont toujours joué un rôle considérable et multiple dans la conservation et la transformation du lait et des produis laitiers, notamment des laits fermentés, des crèmes, du beurre et des fromages, c'est ainsi quelles jouent maintenant et d'avantage encore dans le futur un rôle de locomotive dans les procédés biotechniques de fabrication des produits laitiers.

C'est dans ce sens d'idées que nous sommes proposés de mener notre étude.

Dans un premier temps, on va faire le point de connaissance sur les bactéries lactiques, leurs métabolismes et leurs intérêts industriels.

Dans la deuxièmes partie, on va isoler, purifier et pré-identifier des souches de bactéries lactiques à partir du lait cru, par la suite on va étudier quelques performances technologiques et pour finir, on va étudier les interactions entre les différents genres.

CHAPITRE I

Notions générales sur les bactéries lactiques :

I-1- Définition :

On considéré comme bactéries lactiques, toute bactéries capable d'excréter l'acide lactique (**D(-)** , **L(+)** ou **DL**) .

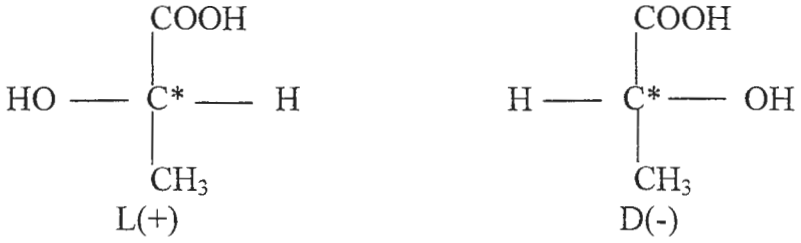


Figure 1 : Différents isomeres de l'acide lactique Cherrak et Keddari(1999 *in* Leveau *et al.*,19991).

Cette notion peut être affinée en désignant le substrat glucidique à partir duquel est faite cette sécrétion (lactose , glucose...) , en évaluant la quantité d'acide lactique produit par rapport à la quantité du substrat dégradé , ce qui revient à évoquer les voies métaboliques empruntées pour cette sécrétion :

- Voie d'EMBDEN MAYERHOF – PARNAS, homofermentation dans laquelle l'acide lactique est le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat.
- Voie de DICKENS – HORECKER et d'ENTER DOUDOROFF , hétéro fermentation , conduisant à l'acide lactique , en mélange avec d'autres produits : éthanol , dioxyde de carbone (CO_2) , acide acétique , propionique...(**Bourgeois** et **leveau , 1980**) .

I-2- Propriétés générales :

D'après **Bourgeois** et **Larpent (1996)**, la propriété principale des bactéries lactiques est la production d'acide lactique mais, il convient de prendre en compte de nombreux caractères microbiologiques :

- Elles sont Gram (+) positif.
- Elles ne sporulent pas.
- Elles sont pour la plupart immobiles.
- Elles sont aéroanaerobies facultatives (micro aérophiles).
- Même en présence d'oxygène (O_2), elles sont incapables de respirer. Ceci est d'ailleurs corrélé à leur incapacité de synthétiser les cytochromes et les enzymes de noyau hème, mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire.
- Pas de réduction de nitrate en nitrite.
- Elles ont en générale des besoins complexes en facteurs de croissance comme : vitamine B , acides aminés , peptides , bases puriques et purimidiques .

- Elles peuvent être sous formes de bâtonnets (*Lactobacillus*) ou sous formes sphériques (streptocoques).

I-3- Origine :

Selon **Lenoir** et ***al.*, (1992)**, la présence de bactéries lactiques est revelée dans de nombreux milieux riches en nutriments , Comme la multitude de produits alimentaires (lait, viandes et produits végétaux).

Les espèces des genres *Streptococcus* , *Lactococcus* ou *Leucouostoc* se rencontreront plutôt chez les hommes, les animaux et les oiseaux, on peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales et des poussières , mais aussi de l'ensillage du foin ou des grains .

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répondues dans la nature, on les trouve dans les végétaux où elles assurent l'acidification de l'ensillage.On les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme, car *Lactobacillus* résiste aux biliaires.Peu d'espèces ont un caractère pathogène.

Les espèces du genre *Pédiococcus* ne ce rencontre pratiquement que sur les plantes.

I-4 Classification :

D'après **Sutra** et ***al.*, (1998)** , la classification des bactéries lactiques vient d'être revue et simplifiée , compte tenu des apports modernes de la taxonomie moléculaire qui est basée sur le séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) .

Les bactéries lactiques appartiennent aux cinq (5) genres :

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

I-4-*1 Le genre Streptococcus :*

Les espèces de ce genre ont une forme ronde et sont assemblées par deux ou en chaîne, très exigeantes du point de vue nutritionnel. La plupart des espèces sont thermophiles, leur fermentation est homolactique (**Guiraud, 1998**).

L'espèce *Sc. thermophilus* se différencie des autres par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène (**Leveau** et **Bouix, 1993** ; **Sutra** et ***al.*, 1998).**

I-4-2- *Le genre Lactococcus :*

Le genre *Lactococcus* récemment défini doit être considéré dans le genre *Streptococcus* .

Ce sont des cellules sphériques, mésophiles, peuvent quelques fois s'allonger, elles produisent l'acide lactique L (+) (**Leveau** et **Bouix, 1993**).

Les espèces de ce genre sont associées à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, largement présent dans le lait et les produits laitiers. Certains espèces isolées de poissons et d'eau douce possèdent la particularité d'être mobile (**Sutra** et ***al.*, 1998**).

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

Il rassemble les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes, mésophiles, généralement capsulés, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide lactique (isomère **D**), de CO_2 et l'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère une activité aromatique importante, ils ne sont pas pathogènes.

Ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés ou les végétaux (**Sutra** et ***al.*, 1998**).

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

Ce sont des cellules sphériques, elles peuvent être en paires et en tétrades. Les *Pediococcus* sont homofermentaires, produisent de l'acide lactique **DL** ou **L** (+), elles sont mésophiles, et le plus souvent incapables d'utilisés le lactose.

Ce sont des agents de dégradation des brasseries (*Pc. damnosus*) et causent aussi des altérations (viscosité) dans les produits végétaux et parfois les viandes et poissons.

La classification de **Bergey** recense 08 espèces dans ce genre (**Leveau** et ***al.*, 1991) :**

- *Pc. damnosus* .
- *Pc. parvulus.*
- *Pc. inopinatus.*
- *Pc. pentosaceus.*
- *Pc. dextrinicus.*
- *Pc. acidilactici.*
- *Pc. holophilus.*
- *Pc. urinaeequi.*

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

Il s'agit de bacilles souvent allongés, parfois groupés en paires ou en chaînes. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatiles, de l'éthanol et CO_2 a coté du l'acide lactique.

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

D' après **Guireaud,(1998),** Le genre *Lactobacillus* à été subdivisé par **Orla-jensen 1919** en 3 groupes :

Groupe I : ***Thermobactérium*** : homofermentaire et thermophile, ce groupe comprend 15 espèces, les plus fréquents sont : *Lb .helveticus ,Lb. jugerti, Lb. bulgaricus, Lb. lactis, Lb. acidophilus, Lb. leichemnii, Lb. delbrueckii, Lb. kefirofaciens.*

Groupe II : ***Streptobacterium*** : homofermentaire et mésophile, il comprend 11 espèces , permis lesquelles *Lb. Casei, Lb. Plantarum, Lb. curvatus, Lb. sake.*

Groupe III : ***Betabacterium*** : hétérofermentaire, soit mésophile soit thermophile. Les espèces les plus fréquentes sont : *Lb. buchneri, Lb. brevis, Lb. kefir, Lb. Hilgardii.*

Tableau N°1 : différents genres de bactéries lactiques et les domaines d'utilisation (**Sutra** et ***al.***, **1998; Leveau** et ***al*** ., **1991**)

Genre	Morphologie	Type fermentaire	Isomère de l' acide lactique	Température de croissance	Principaux domaines d'utilisation
Lactococcus	Coques	Homo	**L (+)**	Mésophiles	Fromages. Lait et crèmes fermentés.
Streptococcus	Coques	Homo	**L (+)**	Mésophiles thermophiles	Laits fermentés et fromages.
Leuconostoc	Coques	Hét	**D (-)**	Mésophiles	Fromages. Lait et crèmes fermentés.
Pediococcus	Coques en tétrades	Homo	**DL**	Thermophiles	Fromages. Lait et crèmes fermentés.
Lactobacillus	Bacilles	Homo Hét	**D (-)** **DL**	Thermophiles Mésophiles	Lait fermenté. Fromages. Saucissons. Probiotiques.

Homo : Homofermentaires
Hét : Hétérofermentaire

Chapitre II

Biochimie des bactéries lactiques :

II-1- Métabolisme des sucres :

D'après **Desmazeaud (1996),** les bactéries lactiques homofermentaires convertissent le glucose en acide lactique.

Le glucose (ou le lactose dans le cas du lait) est transporté par un système actif et selon les espèces, peut être phosphoryle lors du transport à travers la membrane cellulaire. Dans ce cas , par exemple les Lactocoques mettent en jeu un système phosphotransfèrase (PTS) qui phosphoryle le sucre aux dépend du phospho-enol pyruvate (PEP). Ainsi, chez les Lactoques et certains *Lactobacillus* , le lactose du lait apparaît dans la cellule sous forme du glucosyl-β(1,4)-galactoside - 6 -p (ou lactose-P), il est donc prêt à être hydrolysé par une β-D-phosphogalactosidase. A l'opposé, les Streptocoques, les Lactobacilles et des Leuconostoc transportent le lactose sous forme libre.

Le glucose ou le glucose - phosphate en résultant est alors dégradé suivant la voie glycolytique d'Embdem Meyerhof -Parnas. Le galactose 6-phosphate est catabolisé selon la voie de D- tagatose -6- phosphate.

Toutes les bactéries lactiques possèdent donc une lactate-déshydrogénase.

Les germes hétérofermentaires utilisent les voies du tagatose -6- phosphate. Ainsi, chez ces bactéries, la fermentation lactique conduit à la formation de quantités équimoléculaires de lactate, d'éthanol et de CO_2.

II-2-Utilisation du citrate :

Le citrate est transporte à l'intérieur des cellules par une citrate perméase, où il est scindé en acétate et en oxaloacetate par une enzyme citrate -lyase. Chez *Lactococcus lactis*, cette enzyme est inductible par le citrate mais constitutive chez *Loctococcus* sp.

L'oxaloacetate est ensuite convertie en pyruvate et en CO_2 par une oxaloacetate décarboxylase. La deuxième étape de décarboxylation donne l'acetaldehyde-thiamine pyrophosphate.

Deux voies différentes conduisent au diacetyl où à l'acetoîne par l'acetoîne réductase, on obtient le 2,3 butylen glycol a partir de l'acetoîne. Le citrate réprime la synthèse de cette enzyme, ainsi que celle du diacetyl-reductase ce qui explique l'accumulation de diacetyl ou l'acetoîne chez *Lactococcus* sp. **(Desmazeaud, 1996).**

II-3- Métabalisme des lipides et des esters :

L'activité lipolytique des lactocoques dans le lait serait faible, cependant ces bactéries hydrolyseraient plus facilement les mono-et diglycerides que les triglycérides du lait .

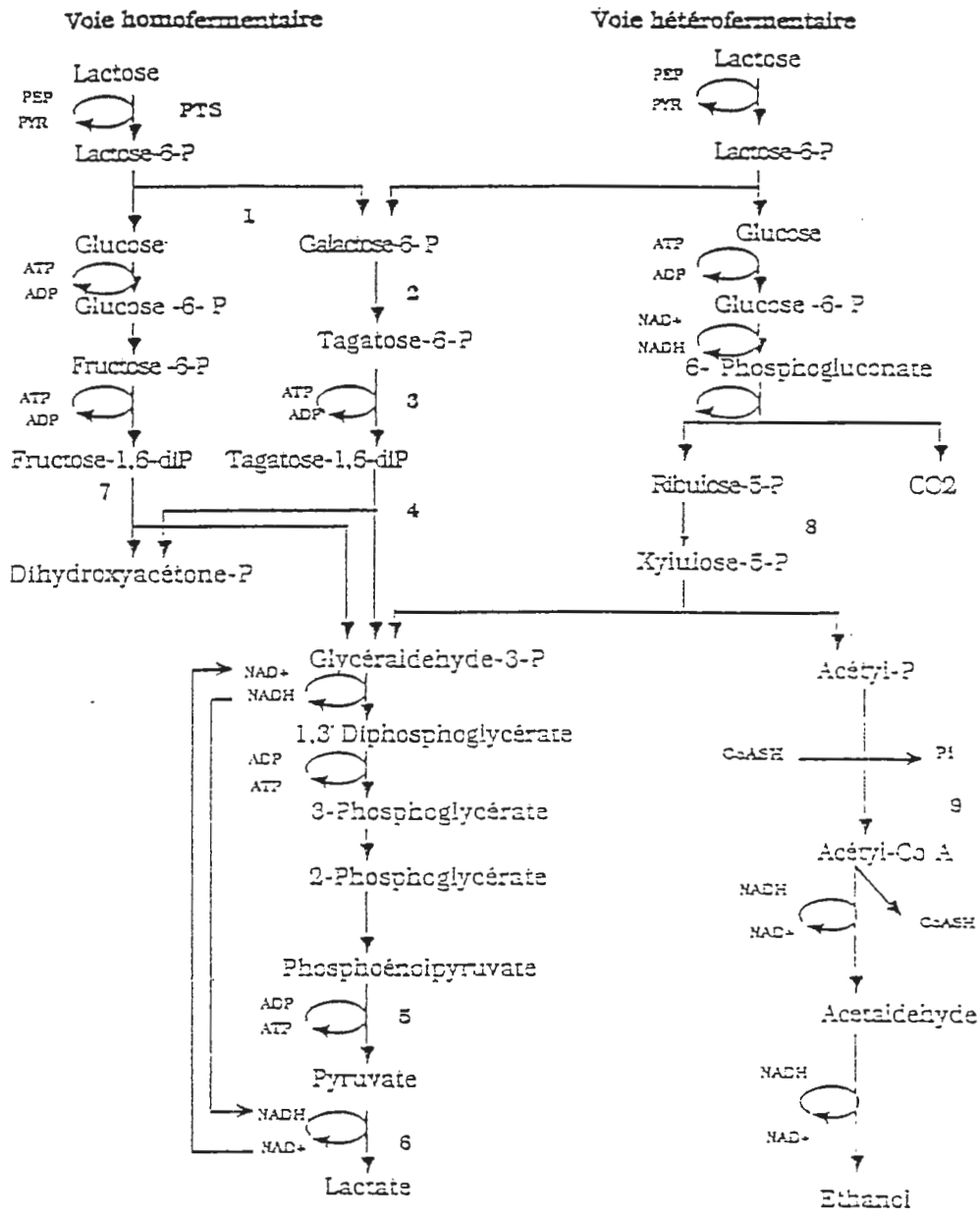


Fig. 2 : La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire

Leveau et Bouix, 1993.

(1) : phospho-β-galactosidase ; (2) : tagatose-6-phosphate isomérase ; (3) : tagatose-6-phosphate kinase ; (4) : tagatose-1,6-diphosphate aldolase ; (5) : pyruvate kinase ; (6) : lactate déshydrogénase ; (7) : fructose-1,6-diphosphate aldolase ; (8) : pentose-5-phosphate cétolase ; (9) : éthanol déshydrogénase

Au contraire les triglycérides contenant des acides gras à chaînes courtes sont les plus facilement hydrolysées chez *Lactobacillus*.

Les activités lipasiques et esterasiques ont été dementrées chez certains *Loctobacillus* homofermentaires comme *Lb. casei et Lb. acidophilus* ou hétérofermentaires comme : *Lb. fermentum* **(Leveau** et **Bouix, 1993** ; **Leveau** et ***al.*, 1991).**

II-4- Métabolisme des protéines :

Les bactéries lactiques dégradent les protéines pour satisfaire leurs besoins en acides animés par système protéolytique complexe , car elles sont , en général incapables d'en effectué la synthèse à partir d'une source azotée minérale simple et ne satisferont qu'une partie du leurs besoins par les acides animés libres .

Dans différents genres de bactéries lactiques *(Lb, Ln, Lc)*, C'est une protéase liée aux enveloppes cellulaires grâce aux ions Calcium , qui réalisé la première étape du processus de dégradation , les protéines seront hydrolysées jusqu'aux stade acide animé par différentes peptidases membranaires et cytoplasmiques , après leurs transport dans le cytoplasme (**Desmazeaud, 1996**).

Chapitre III

Rôles et intérêts des bactéries lactiques :

III-1- Introduction :

Les bactéries lactiques ont deux rôles principaux dans les aliments, liés à leur activité métabolique :

- 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 produits concernés, quelles soient ou non fermentées **(Sutra** et ***al* ., 1998).**

III-2- Rôle en industries laitieres :

III-2-1- Production de l'acide lactique :

La production d'acide lactique et l'abaissement du pH est nécessaire pour établir des conditions physico-chimiques indispensables ou favorables à la fabrication de nombreux produits **(Lenoir** et ***al.*, 1992).**

III-2-2- Production des composées carbonylés a partir de citrate :

Le citrate joue un rôle essentiel , a partir de ce composé les bactéries lactiques produisent le diacetyl , l'acétaldéhyde , l'acétate et le dioxyde de carbone (CO_2) qui sont les principaux responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés **(Leveau** et ***al* .,1991)**

III-2-3- production d'acétaldéhyde :

L'acétaldéhyde est réduit par le métabolisme chez les bactéries lactique mésophiles, donc ils n'en apparaît que très peu dans le milieu.

Mais, il peut en être autrement chez les bactéries lactiques thermophiles, en effet, les gérmes du yaourt ne possèdent pas l'alcool Déshydrogénase et l'acétaldéhyde intracellulaire de ces microorganismes, ne sera pas réduit en éthanol ,mais sera excrète comme produit final **(Lenoir** et ***al.*, 1992)**.

III-2-4- Le rôle de la protéolyse dans l'arôme et le goût :

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

La protéolyse due aux bactéries lactiques sera surtout conduite à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des procurseurs pour de nombreux produits d'arôme **(Lenoir** et ***al.*, 1992)**.

III-2-5- Production de polysaccharides :

Certaines souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétisér des exopolysaccharides , glucanes (dextrane) et fructosanes (levanes) , qui constituent la capsule cellulaire, ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits dans lesquels se développent les souches compétentes **(Leveau** et ***al.*, 1991).**

a- cas des bactéries thermophiles :

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

Selon les souches, les concentration produites,varient de 50 à 400 mg/ litre du lait.

Le galactose est le monomère majeur, alors que le glucose et le rhamnose sont présents en plus petites quantités chez *Lb. bulgaricus*, ou le glucose, xylose, arabinose, rhamnose et mannose chez *Sc. thermophilus* **(Lenoir** et ***al.*, 1992)**.

b- Cas des bactéries mésophiles :

Certaines bactéries lactiques, notamment les lactabacilles et leuconostoc produisent des polysaccharides.

Ils sont responsables de la formation de films muqueux en surface des produits carnés, conservés sous vide ou des produits de salaisons (Jambo).

Des Pediocoques sont également à l'origine de l'apparition d'une viscosité de la bièrre.

Certaines souches de Lactocoques produisent de grandes quantités de polysaccharides dans le lait, elles servent à fabriquer des produits laitiers traditionnels dans les pays scandinaves.

Les basses températures de fermentation favorisent l'apparition de la viscosité **(Lenoir** et ***al*** **., 1992).**

III-2-6- Rôles des bactéries lactique dans la production de gaz :

Ce sont les bactéries hétérofermentaires qui sont responsables de la production de gaz permettant la formation de fissures, dans des fromages à pâtes persillées (roquefort).

Devoya et ***al.*****, (1972)** , ont montré que les espèces de *Leuconostoc* sont les responsables de formation des « yeux de fromage ».

III-2-7- Rôle dans la production de facteurs antimicrobiens :

III-2-7-1- l'acide lactique et le pH :

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques (*Escherichia coli, Salmonella* .....) des produits laitiers.

Deux facteurs principaux parfois difficilement dissociables doivent être pris en compte : le pH et les acides , notamment l'acide lactique qui est le facteur toxique pour les bactéries lactiques qui contribue à diminuer le pH du milieu, augmentant ainsi la toxicité de l'acide acétique **(Lenoir** et ***al.*****, 1992).**

III-2-7-2- Composés divers :

Les quantités de diacetyl produit par les bactéries lactiques sont en général trop faibles pour être inhibitrices.

En présence d'oxygène (O_2) les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est toxique pour différentes bactéries, ce composé par lui même est capable d'endommager les membranes bactériennes (germes à GRAM négatif). De plus l'H_2O_2 peut aussi provoquer des altérations au niveau de l'ADN chez *Escherichia coli* **(Lenoir** et ***al.*****, 1992).**

III-2-7-3- Les bactériocines et la nisine :

Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches des bactéries lactiques, ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur les bactéries à Gram positif **(Sutra** et ***al.*****, 1998).**

En général, les bactériocines sont produites en milieu complexe vers la fin de la croissance exponentielle lorsque le pH est déjà bas.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* est capable d'inhiber la germination et la croissance de *Clostridia*, de *Bacillus* et de *Listeria* **(Lenoir** et ***al.*** **,1992).**

Le rôle de 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 (**Sutra** et ***al.*, 1998**) .

D'autres bactériocines, comme les pediocines (produites par *Pédiococcus*) ou la sakacine A (produite par *Lactobacillus sake*) sont aussi capables d'inhiber *Listeria monocytogenes* (**Desmazeaud, 1996**).

Deuxième Partie

Materiel et Méthodes

II- Matériel et méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire du centre universitaire de Jijel.

II-1- Matériel :

II-1-1 Le lait cru :

L'échantillon sur lequel on fait notre travail est d'origine jijilienne issue d'un lait de vache de race autochtone (région de CHEKFA).

II-1-2 Milieux de culture :

C'est l'habitat où les différentes formes bactériennes peuvent être cultivées en vue de leur isolement et identification.

Au cours de notre étude, on a utilisé les milieux de culture suivants :

- Gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe) favorise le développement des Loctabacilles .
- Gélose M17 : Milieu d'isolement des Streptocoques , Lactocoques , Leuconostoc et Pediocoques .
- milieu Y.M.A : (Yeast Milk Agar) : utilisé pour la recherche de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.
- Gélose hypersaccharosée : utilisée pour la recherche de la production d'exopolysaccharides .
- Milieu de Gibson Abdelmalek : utilisé pour la recherche du type fermentaire.

II-1-3 Autres produits :

Au cours de notre étude, on a utilisé :

- L'eau oxygénée (H_2O_2).
- Les colorants (violet de gentiane, fuschine).
- L'alcool.
- Bleu de Methylene (0.1% - 0.3%).
- Chlorure de Sodium (Nacl).
- Les sucres (Saccharose, glucose....).
- Phénol phtaleine.
- Soude (NaOH) N/9.

II-2- Méthodes :

II-2-1 Isolement , purification , caractérisation et pré-identification des souches de bactéries lactiques :

a- Isolement :

Pour l'isolement des bactéries lactiques, il convient de respecter les conditions suivantes : utiliser le milieu de culture adéquat, la température d'incubation idéale et les conditions d'anaérobiose.

Pour la préparation des dilutions, la première dilution décimale (10^{-1}) est obtenue en ajoutant 1 ml de lait cru au 9 ml d'eau physiologique.

On renouvelle le processus à partir de la dilution (10^{-1}) pour obtenir la dilution (10^{-2}) et à partir de cette dernière, on obtient la dilution (10^{-3}).

On doit changer de pipette après chaque dilution.

b- purification :

La purification consiste a réalisé des repiquages successifs sur les géloses (MRS et M17) pour des colonies bien distinctes et homogènes.

Dés qu'on obtient sur les boites de pétri des colonies bien homogènes on arrête la purification.

La figure N°1 présente les techniques qu'on a utilisé pour l'isolement et la purification des souches.

c- Caractérisation et pré-identification :

Pour l'identification de nos souches on a utilisé les méthodes classiques d'identification qui sont basées sur la recherche pour chaque souche d'un certain nombre de caractères morphologiques , physiologiques et biochimiques (**Lenoir** et ***al.*, 1991**) .

c-1-Examen macroscopique:

Ce test vise à voir la taille des colonies, leur couleur et forme sur les boites de pétri après incubation à 37°c/24 H.

c-2-Examen microscopique :

L'examen de préparation microscopique revelée par la coloration de Gram permet de faire la distinction entre les $Gram^+$ et les $Gram^-$ (**Leveau** et ***al.*** , **1991**).

المكتبة

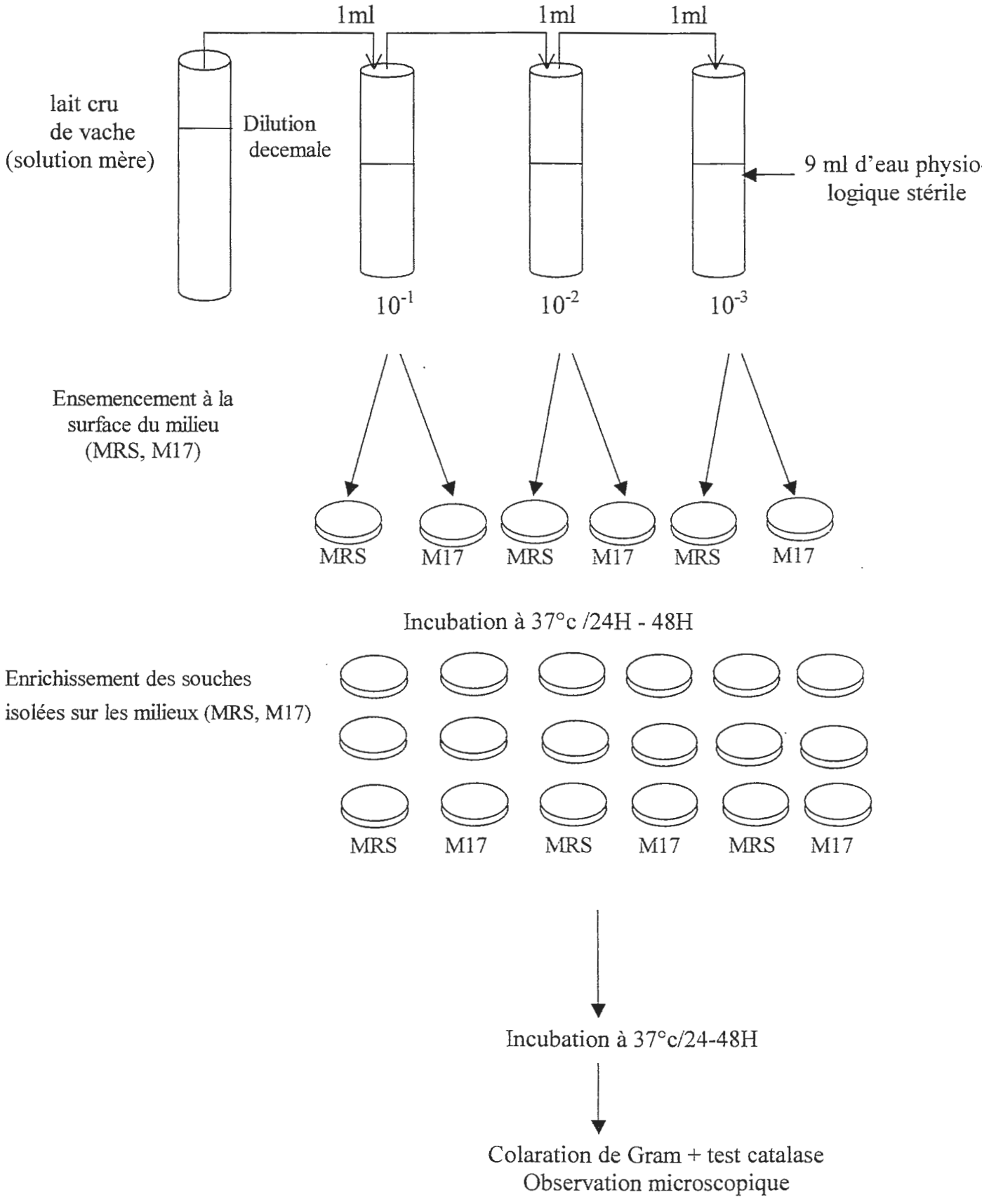


Figure 3 : techniques d'isolement et de purification des souches lactiques

Après préparation du frottis bactérien sur la lame est sa fixation à la flamme, on met quelques gouttes de violet de gentiane pendant 1 minute, après lavage au lugol et un rinçage à l'alcool, on met quelque gouttes de fuschine et on laisse agir pendant 1 minute, enfin on fait un rinçage à l'eau suivis par un séchage , et on passe a l'examination microscopique .

L'observation microscopique permet de distinguer la forme et la disposition des bactéries.

c-3- Tests physiologiques et biochimiques :

- **Recherche de la catalase :**

- Elle se fait par émulsion de la culture bactérienne à tester dans l'eau oxygénée.
- La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition des bulles d'oxygènes.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O+1/2\ O_2$$

- **Test de croissance à différentes températures :**

Nous avons incubé les souches à tester cultives sur gélose MRS et M17 aux températures 45°c, 15°c et 37°c , pendant 24 à 48 H, les bactéries lactiques mésophiles poussent à 15°c alors que les bactéries thermophiles ne le font pas .

- **Test de croissance en milieux hostiles :**

-Le lait de SHERMAN :

Ce test donne l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène, pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, on a ajoute au moment de l'emploi à 9 ml de lait stérilisé en tube, 1 ml de bleu de méthylène à 0.1%, ce test est surtout intéressant pour différencier les *Streptococcus* et les *Lactococcus*.

On refait le test avec 0.3% de bleu de méthylène. Ainsi *Lactococcus lactis* est capable de pousser à 0,3% de bleu de méthylène, les Streptocoques fécaux ne se développent qu'en présence de 0,1% quant à *Streptococcus thermophilus*, il est très sensible aux colorants utilisés dans ce test.

-Le bouillon hypersalé :

On ensemence les milieux MRS et M17 supplémentes de 4% et 6,5% de chlorure de sodium (Nacl) par les souches à tester.

L'incubation se fait à 37°c pendant 24 à 48 heures, la croissance est appréciée par apparition de Colonies. Seul les streptopoques fécaux poussent à 6,5% de Nacl.

- **Recherche de l'Argenine dihydrolase (ADH) :**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques , cette enzyme libère l'amoniac , et la citrulline à partir de l'argenine. Pour la détermination proprement dite , on ensemence avec le germe à tester , un tube de milieu de base et un tube de milieu à l'argenine, la culture dans le milieu de base se manifeste par un virage au Jaune du milieu du au métabolisme du glucose , la dégradation de l'argenine et la libération d'amoniac empêche le virage au Jaune .

- **Production de polysaccharides (dextrane) :**

On utilise le milieu de base qui est le MRS additionné de 5% de saccharose, après l'ensemencement, on a incubé à 37°c /24 - 48 H.

Les souches déxtranigènes sont caractérisées par la formation sur le milieu de colonies larges et gluantes.

- **Recherche de type fermentaire:**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO_2).

On a préparé préalablement le milieu de Gibson-Abdelmalek . Pour réaliser ce test on ensemence le milieu de base et on fait couler un bouchon de gélose à la surface.

l'incubation est faite à 37°c /24 – 48 H.

II-2-2 Etude de quelques propriétés technologiques :

a-Etude du pouvoir acidifiant : (AFNOR. VO4-206,1969)

Chaque souche est ensemencée dans un flacon de 200ml de lait stérile et incubée à 37°c.
Les mesures se font à 2H, 4H, 6H, 8H, 10H et 12H pour chaque deux échantillons de chaque flacon.

L'acidité est déterminée par dosage titrimétrique de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium en présence de phénol phtaléine. Cette détermination s'effectue sur une prise d'essai de 10ml de lait (apparition de coloration rose pâle). Pour se faire, on ajoute 5 gouttes de phénol phtaléine pour chaque 10 ml de lait, on homogenise et on titre par la soude dornic jusqu'à l'apparition d'une coloration violette persistante.

L'acidité en degré dornic est déterminé par la formule suivante :

Acidité (°D) = V_{NaOH} X 10 .
V : Volume de NaOH (N/9) .

b-Recherche de l'activité protéolytique :

Ce test va mettre en évidence l'hydrolyse des protéines par les bactéries Lactiques Le test est réalisé sur le milieu Y.M.A (Yeast Milk.Agar) qu'on a préparé au préalable.

Les différentes souches sont ensemencées en touche à la surface du milieu Y.M.A. On laisse les touches séchées puis on incube à 37°c/24- 48H. La Lecture de résultats est effectuée par mesure de la dimension des anneaux claires autour des touches (**Leveau** et ***al.*, 1998).**

c-Production d'éxopolysaccharides :

On a ensemencé aseptiquement les différentes suspensions bactériennes sur le milieu MRS dans lequel on a remplacé le glucose par le saccharose (20g/l) et on incube à 37°c/24-48H.

La production d'exopolysaccharides se manifeste par la présence de colonies larges et gluantes.(**Leveau** et ***al.*, 1991) .**

II-2-3- <u>Les interactions bactériennes</u> :

Les interactions chez les bactéries lactiques peuvent être : positives ; (stimulation) , négatives (inhibition) ou neutres .

-Il y a symbiose : lorsque deux espèces différentes vivent ensembles.

- Antagonisme : est une lutte réciproque de deux espèces) ceci emprunte différents mécanismes :

* L'antibiose : est l'inhibition par des substances relativement spécifiques très actives élaborées en petites quantité telles que les bactériocines.
* L'isoantagonisme : est l'inhibition entre couple de souches de même espèce.
* L'héteroantagonisme : est l'inhibition entre couple de souches d'éspèces différentes **(Idoui, 1994).**

Les souches qu'on a étudié sont ensemencées en touches par un multipoint stérile à la surface du milieu solide (MRS ou M17). L'osque les dépôts son bien secs , on couvre la culture avec 5 ml de gélose (MRS ou M17) fondue contenant 1 ml d'une culture jeune de souches indicatrices .

Après solidification du milieux, les boites de pétri sont incubées à 37°c pendant 24H-48H.

La lecture consiste à déterminer la dimension des anneaux d'inhibition autour de chaque souche ensemencée en touche.

Troixième Partie

Résultats et Discussion

III-1- Isolement purification et pré-identification des bactéries lactiques :

- **Examen macroscopique :**

on a observé des colonies de différentes tailles , bien isolées , de couleur blanchâtre et jaunâtre brillante , à pourtour régulier , certaines ont des formes circulaires et lenticulaires (convexe) .

- **Examen microscopique :**

Aprés la purification des souches et la recherche de la catalase, les observations au microscope optique révèlent deux formes de bactéries lactiques .
- Des bâtonnets disposés en chaîne plus ou moins longues , se sont des lactobacilles .
-Des Coques disposés par paire (diplocoques) et en chaîne (strepto-diplocoques), se sont les lactocoques .

Toutes les souches isolées (17 souches) sont de couleur bleu-violet .

- **Tests physiologiques et biochimiques :**

Les résultats du tableau N°02 révèlent le suivant :
-Les dix-sept (17) souches sont à catalase négative (pas d'apparition des bulles d'air) .

- Le test de croissance à différentes températures montre que l'ensemble des souches sont incapables de croître à 45°c, mais donnent une croissance aux deux températures restantes (souches mésophiles) .
- Huit souches ont donnée un résultat positif sur le lait de SHERMAN à 0,3% de Bleu de méthylène c'est à dire , il y a eu réduction de bleu de méthylène avec coagulation du lait , de ce fait ces souches appartiennent à *Lactococcus lactis* sp .
- Avec le bouillons hypersalé , on a éliminé les streptocoques fécaux qui ont donné un résultat positif avec 6,5% de Nacl , le reste des souches sont des lactocoques .
- Sur le milieu de Gibson-Abdelmalek , il n'y a eu aucun déplacement du bouchon de la gélose , donc nos souches sont homofermentaires .

- L'aspect des souches bactériennes révèle la dominance de la forme sphérique qui représente 64,70% de la collection , le reste 35,29% est représenté par la forme bâtonnet .

Enfin , toutes les souches sont à $GRAM^+$, $catalase^-$, mésophiles et homofermentaires .

Les résultats que nous avons obtenus après les tests physiologiques et biochimiques , nous permettent d'identifier deux genres :
-*Lactobacillus* sp : qui représente 35,29% du total .
- *Lactococcus lactis* sp : qui représente 47,05% .
-*Lactococcus* sp : qui représente 17,64% .

Tableau N°2 : Les principaux caractères physiologiques et biochimiques de la collection lactique .

Tests / Souches	Forme	Catalase	ADH	Culture en Nacl		Lait de SHERMAN		Croissance à différentes T°		Type fermentaire	dextrane	Identifier à
				6,5%	4%	BM 0,1%	BM 0,3%	15°c	45°c			
S01	Cocci	-	+	-	-	+	+	+	-	Homo	-	*Lactococcuc lactis* sp
So2	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
So3	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
So4	Cocci	-	+	-	+	+	-	+	-	Homo	-	*Lactococcus* sp
So5	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
So6	Cocci	-	+	-	-	+	-	+	-	Homo	-	*Lactococcus* sp
So7	Cocci	-	+	-	-	-	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
So8	Cocci	-	+	-	-	+	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
So9	Cocci	-	+	-	-	+	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
S10	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
S11	Cocci	-	+	-	+	+	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
S12	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
S13	Cocci	-	+	-	-	+	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
S14	Cocci	-	+	-	+	+	-	+	-	Homo	-	*Lactococcus* sp
S15	Bacille	-	+	/	/	/	/	+	-	Homo	-	*Lactobacillus* sp
S16	Cocci	-	+	-	-	-	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp
S17	Cocci	-	+	-	-	-	+	+	-	Homo	-	*Lactococcus lactis* sp

S : Souche
T: température

+ : test positif
- : test négatif
/ : indeterminé

ADH: Argenine dehydrolase.
Homo : Homofermentaire .
BM: Bleu de Méthylène

III-2 Aptitudes technologiques :

III-2-1 Pouvoir acidifiant :

Les tableaux N°3- N°4 représentent les résultats de la production d'acide lactique par les souches de bactéries lactiques .

Les résultats obtenus permettent de dire que nos souches possèdent une performance acidifiante intéressante pour la fabrication des produits laitiers .

D'après les figures N°2et N°3 , il apparaît clairement qu'il y a une hétérogénéité dans la production de l'acide lactique au sein des souches des deux genres , c'est ainsi , qu'on a note que chez le genre *Lactococcus* , une quantité de 7g d'acide lactique /1l de lait est produit par *Lactococcus lactis* sp08 , 6,5g/l sont produit par *Lactococcus lactis* sp13 et la plus faible conversion de lactose en acide lactique est enregistrée avec la souche *Lactococcus lactis* sp17 estimé à 3,1 g/l après 12H d'incubation .

Toutefois , les souches du genre *Lactobacillus* sont moins performantes dont un maximum de 6,4g d'acide lactique /l de lait est produit par *Lactobacillus* sp02, par ailleurs l'obtention de la coagulation du lait après 12H d'incubation , témoigne que nos souches sont acidifiantes et elles sont dites « Fast Acid Producer » (**Leveau** et ***al*** **., 1991**) .

III –2-2 Activité protéolytique :

Les résultats de l'hydrolyse des protéines par les souches lactiques sur le milieu Y.M.A sont représentés dans le tableau N° 5

D'après **Vuillemard** ***(in*** **Lenoir** et ***al.,*** **1991**), la souche est protéolytique pour un diamètre de l'anneau ≥ 5mm.

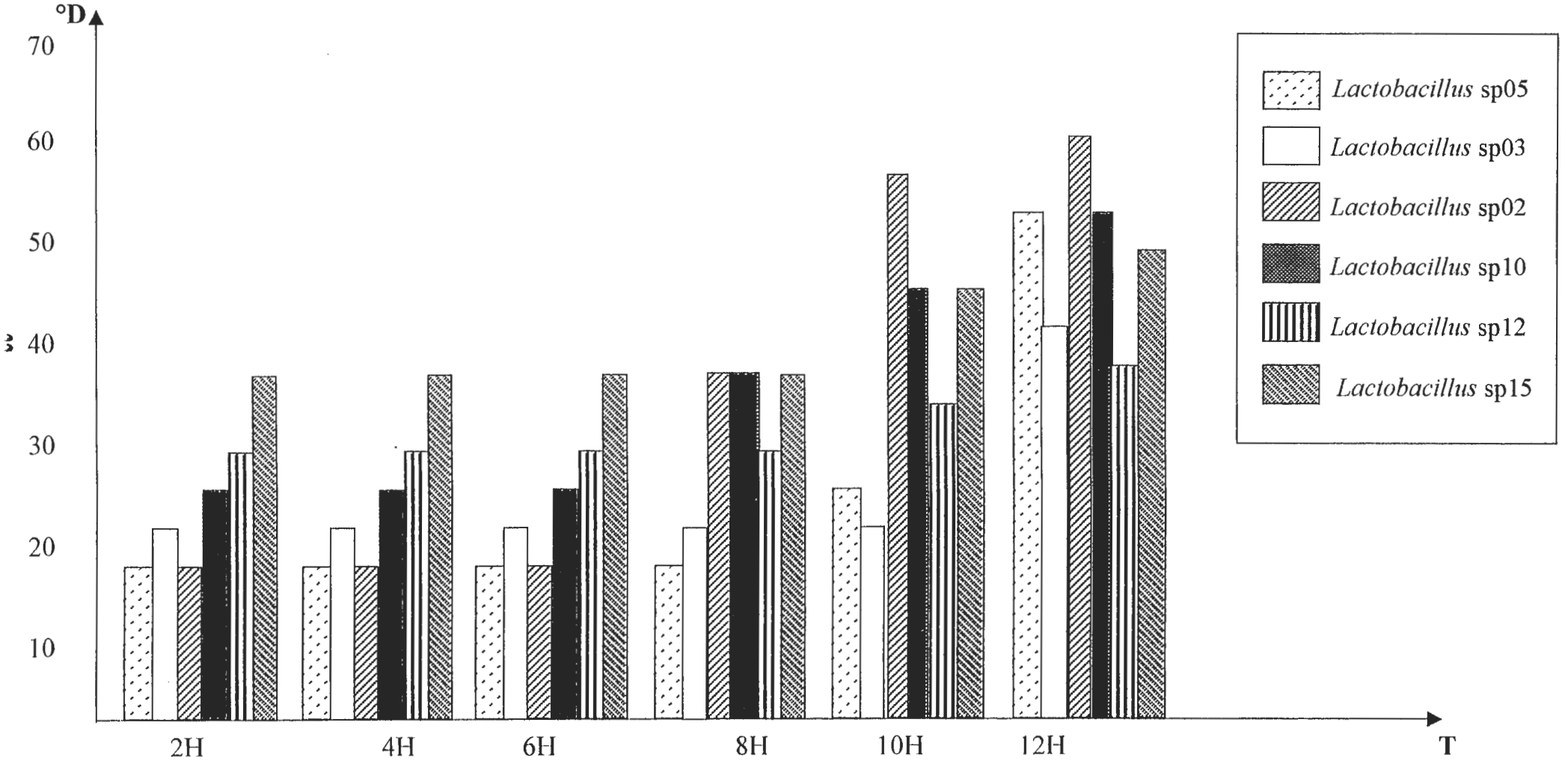
Au cours de ce test, nous avons observé qu'il y a une croissance des souches ensemencées en touche, mais sans protéolyse, donc ce milieu fourni les facteurs de croissance aux bactéries lactiques et ces dernières sont incapables d'hydrolyser les protéines présent dans le milieu. Cette inaptitude à l'hydrolyse des protéines chez les souches testées est probablement liée à la perte ou l'absence du gêne ou de plasmides codant pour cette activité car d'après **Leveau** et ***al.,*** **(1991),** les propriétés technologiques des bactéries lactiques sont portées par les plasmides .

Enfin, les résultats obtenus autorisent à dire que nos souches ne possèdent pas l'activité protéolytique qui est l'un des critères de sélection de cultures destinées à la production de fromage.

Tableau N°3 : Production de l'acide lactique par les *Lactobacillus* sp(°D).

		2H	4H	6H	8H	10H	12H
Lactobacillus sp 05	1	19	20	20	22,5	27	55
	2	20	18	20	22,5	25	60
	M	18	19	20	22,5	26	57
Lactobacillus sp O3	1	20	20	20	20	25	40
	2	19	20	21	25	22	38
	M	19,5	20	20,5	22,5	23,5	39
Lactobacillus sp O2	1	20	18	22	38	61	62
	2	17	20	22	38	61	63
	M	18,5	19	22	38	61	62,5
Lactobacillus sp 10	1	23	24	30	39,5	49	59
	2	22	24	30	36	42	50
	M	22,5	24	30	37,7	45,5	54,5
Lactobacillus sp 12	1	28	29	30	29	34	35
	2	28	29	30	33	33	34
	M	28	29	30	31	33,5	34,5
Lactobacillus sp 15	1	35	37	39	38	41	47
	2	36	37,5	39	40	40	47
	M	35,5	37,2	39	39	40,5	47

M: Moyenne.
°D :Degré dornic
H :Heure

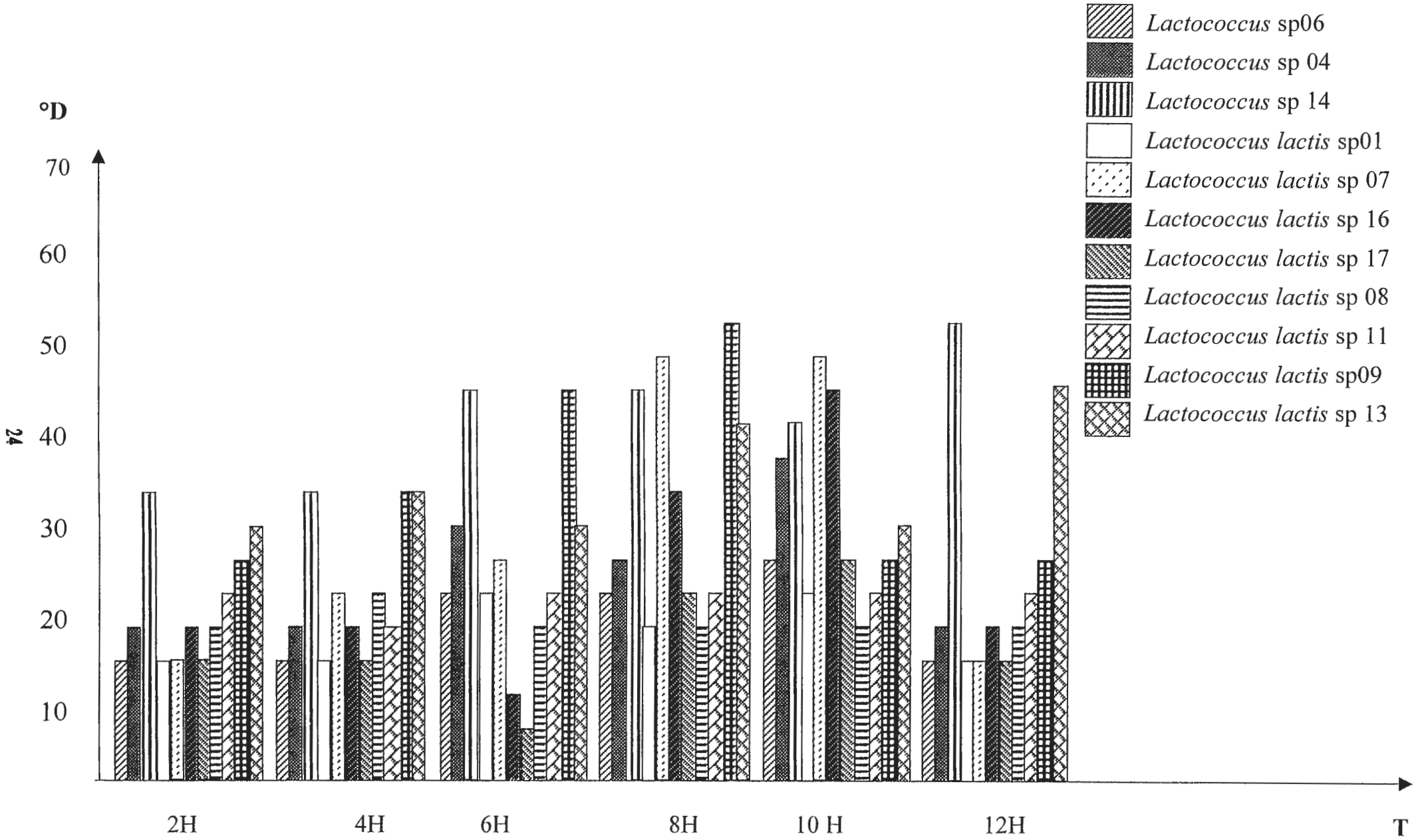


Figue (4) : Production d'acide lactique par les souches de *Lactobacillus*

Tableau N°4 : Production de l'acide lactique par les *Lactococcus lactis* sp et *Lactococcus* sp (°D)

		2H	4H	6H	8H	10H	12H
Lactococcus sp 06	1	20	21	22	23	25	36
	2	15	17	19	21,5	28	39
	M	17,5	19	20,9	22,5	26,5	37,5
Lactococcus sp 04	1	20	20	20	25	40	64
	2	19	22	25	25	40	65
	M	19,5	21	22,5	25	40	64,5
Lactococcus sp 14	1	35	41	42,5	43,5	44,5	48,5
	2	39	35	38	41	46	51,5
	M	37	38	40,5	42	45	50,5
Lactococcus lactis sp 01	1	16	16	22	26	26	47
	2	15,5	18	24	20	25	40
	M	15,5	17	23	23	25,5	43,5
Lactococcus lactis sp 07	1	16	23	27	45	51	62
	2	15	30	30	50	51	64
	M	15,5	24,5	28,5	47,5	51	63
Lactococcus lactis sp 16	1	19	22	23,5	32	44	59
	2	17	19	21	32	46,5	60
	M	18	20,5	22,5	32	45,5	59,5
Lactococcus lactis sp 17	1	16	20	20	24	27	27
	2	15	16	20	25	28	35
	M	15,5	18	20	24,5	27,5	31
Lactococcus lactis sp 08	1	16	22	26	52	60	60
	2	20	24	37	53	62	80
	M	18	223	31,5	52,5	61	70
Lactococcus lactis sp 11	1	20	22	34	47	62	69
	2	21	21	35	48	61	68
	M	20,5	21,5	34,5	47,5	61,5	68,5
Lactococcus lactis sp 09	1	26	35,5	45	70	75	76
	2	25	35	45	54	50	51
	M	25,5	35,2	45	62	62,7	63,5
Lactococcus lactis sp 13	1	28	36	40	46	50	70
	2	35	34	41	44,5	50	60
	M	31,5	35	40,5	40,5	50	65

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



Figue (5) : production d'acide lactique par les souches de *Lactococcus*

Tableau N°5 : activité protéolytique des bactéries lactiques sur le milieu Y.M.A.

Espèces	code	Diamètre (mm)	Evaluation du test	observations
Lactococcus lactis sp	01	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	02	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	03	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus sp	04	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	05	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus sp	06	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	07	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	08	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	09	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	10	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	11	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	12	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus sp	13	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactobacillus sp	14	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	15	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	16	0	-	Croissance sans protéolyse
Lactococcus lactis sp	17	0	-	Croissance sans protéolyse

– : test négatif .

III.2.3 production d'exopolysaccharides :

Le tableau N° 6 montre les résultats du test de la production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques .

Aucours de ce test, on a observé que nos souches ont donné une croissance sur le milieu hypersaccharosé, mais les colonies bactériennes étaient de forme régulière (aucune colonie n'était large ou gluante) , de ce fait, nos souches sont exempte du pouvoir de la production des macromolecules qui contribuent à modifier la texture des produits laitiers.

Les résultats obtenus sont probablement dus aux pertes de plasmides car d'après **Lenoir et *al.*,(1992)** : la formation de polysaccharides épaississants le lait à été rapporte a la présence de plasmides.

III-3 Interactions bactériennes :

Le tableau N°7 représente les résultats obtenus concernant les interactions entre les différentes souches de bactéries lactiques.

Le test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches une fois mis en contact .

Les résultats obtenus ont relevé le suivant :

- Présence des inhibitions : comme le cas(*Lactococcus lactis* sp 08 et *Lactocillus* sp 03), (*Lactococcus* sp 14 et *Lactobacillus* sp 03).
- Présence de stimulation : comme le cas de *(Lactococcus* sp 04 avec *Lactococcus* sp 01)et (*Lactococcus* sp14 et *Lactobacillus* sp 05) et (*Lactococcus* sp04 et *Lactobacillus* sp05).

Ces inhibitions s'expliquent par la synthèse de substances telles que les antibiotiques et les bactériocines, ces derniers ont été mises en évidence chez la plupart des bactéries lactiques, aussi bien chez les lactocoques , que chez les lactobacilles, et chez les pédiocoques (**Idoui, 1994**).

Par ailleurs, on remarque que le *Lactococcus* sp 08 ensemencé en touche inhibe les quatre (04) souches de *Lactobacillus* sp ensemencé en masse.

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

Tableau N° 6: production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques.

Espèces	Code	Evaluation du test	Observations
Lactococcus lactis sp	01	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	02	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	03	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus sp	04	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	05	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus sp	06	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	07	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	08	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	09	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	10	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	11	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	12	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	13	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus sp	14	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactobacillus sp	15	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
lactobacillus sp	16	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	17	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides
Lactococcus lactis sp	18	-	Croissance sans production d'exopoly saccharides

– : test négatif .

Tableau N°7:Les interactions entre quelques souches de bactéries lactiques

ST \ SM	*Lactobacillus* sp 03	*Lactobacillus* sp 10	*Lactobacillus* sp 01	*Lactobacillus* sp 05
Lactococcus lactis sp 08	+	+	+	+
Lactococcus sp 04	+	+	-	-
Lactococcus sp 14	+	+	+	-

SM : souche ensemencée en masse .
ST : souche ensemencée en touche .

+ : présence du zone d'inhibition
- : absence du zone d'inhibition

Conclusion générale :

La première partie de notre étude d'isolement, purification, caractérisation et pré-identification nous a permis d'obtenir une collection de 17 souches mésophiles et homofermentaires, cette collection renferme 39.29% de *Lactobacillus* sp, 47.05% de *Lactococcus lactis* sp et 17.64% de *Lactococcus* sp.

L'étude de la vitesse de l'acidification montre que la majorité de nos souche sont acidifiantes avec un maximum de 7g / l produit par *Lactococcus* sp 08, par ailleurs la recherche de l'activité protéolytique a montré que les 17 souches testées ne possèdent pas cette aptitude technologique.

Certaines souches de bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser des exopoly saccharides, ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits laitiers, nos résultats ont revelé l'absence de cette aptitude technologique chez l'ensemble de la collection lactique.

Le test des interactions a montré que les souches ensemencées en touche présentent des inhibitions (*Lactobacillus* sp03 et *Lactococcus* sp08), et des stimulations(*Lactococcus* sp 04 et *Lactobacillus* sp01) vis à vis des souches ensemencées en masse, donc la mise en évidence de la production des substances antimicrobiennes par nos souches lactiques.

Enfin nous proposons que cette étude soit approfondie en prenant en considération les points suivants :

- étude du profil fermentaire de l'ensemble de la collection par l'utilisation des Galeries API 50 CHS et CHL .
- Identifier les espèces par logiciel API . ATB.

Références bibliographiques

-AFNOR .1995 recueil de normes 319-04-41 .
contrôle de qualité des produits alimentaires .
lait et produits laitiers .

-Bourgois. C.M, Larpent. J.P . 1998 .
Microbiologie alimentaire .
TEC et DOC lavoisier, p :7-16 .

-Bourgois. C.M, Leveau. J.Y . 1980 .
Technique d'analyse et de contrôle dans les industries Agra- alimentaires .
APRIA, TEC et DOC Lavoisier, p :106 .

-Desmazeaud. M. 1996 .
Alimentation et sânté .
Cahiers agricultures 1996, p331-335 .

-Guiraud. J, Joseph, P :1998 .
Microbiologie alimentaire .
collection science et techniques agro-alimentaires, paris, p :90-92 .

-Idoui. T 1994 Mémoire de fin d'études .
Purification, caractérisation et identification de souches de bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel local (jijel), étude de quelques aptitudes technologiques inhibition interbacteriennes reconstution de levains lactiques mesophiles .

-Lenoir. J,Hernier. J, Weber. F.1992 .
Les groupes microbiens d'interêt laitier .
CIPIL, P :9 –40 .

-Leveau. J. y, Bouix .M .1993 .
Microbiologie industrielle .
TEC et DOC , Lavoisier, p :172 – 175.

-Leveau. J.Y , Bouix .M, Roissart. H .1991 .
Technique d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaire .
2eme édition volume III .
TEC et DOC, Lavoisier, p :152 –177 .

-Sutra .L, Federighi.M , Jouve. J.L. 1998 .
Manuel de bactériologie alimentaire .
Polytechnica, p :235-251.

ANNEXE I

I- Milieux d'isolement :

* Milieu M17 :

Peptone trypsique de caséine	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone papaique de soja	5g
Extrait de levure déshydrate	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Glycerophosphate de sodium	19 g
Sulfate de Magnesiun, 7H2O	0,25 g
Acide ascorbique	0,5 g
Agar	9-18 g
Eau	950 ml

Stérilisation 15 mn à 120°c

* Milieu MRS (Man, Rogoza, Sharpe) :

Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
Acétate de Sodium	5 g
Phosphate bipotassique	2 g
Citrate d'Ammonium	2 g
Sulfate de Magnesium, 7H2O	0,2 g
Sulfate de Manganése , 4 H2O	0,05 g
Glucose	20 g
Tween 80	1ml
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 6,2

Stérilisation 15 mm à 120°c

II-Milieux de pré-identification :

* Lait de SHERMAN :

9ml de lait stérilisé en tubes
1 ml de bleu de Méthyléne à 0,1% stérilisé 120°c/20mn
9ml de lait écrèmé stérilisé en tubes
1ml de bleu de Méthyléne à 0,3 stérilisé 120°c/20mn

* Bouillon hypersalé :

Gélose MRS	100ml
Nacl	5 g

On varie la concentration en Nacl de 6,5% à 4 %

*** Argenine dihydrolase (ADH) :**

Le milieu de base :

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Pyridoxal	0,005 g
Solution aqueuse de pourpre de bromocresol à 2%	5 ml
Glucose	0,5g
Eau distilée a SP	1000 ml

pH = 6,4

Le milieu a l'argenine est obtenu en ajoutant 10g d'argenine , la répartition est faite en tubes , stériliser 120°c / 15mn .

*** Milieu de Gibson et Abdelmalek :**

Extrait de levure	2,5g
Glucose	50g
Jus tomate	100 ml
Lait	500 ml
Gelose nutritive ordinaire	200 ml

pH= 6,5

Repartir en tube (8 à 10ml), stréríliser par tyndallisation 3 fois 30mn à 100°c à 24 heures d'intervalle .

III- Milieu Y.M.A (Yeast Milk Agar) :

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Lait écrémé	1g
Agar	15g
H2O qsp	1000 ml

pH=7,1

Stérilisation 120°c/20mn

ANNEXE II

AND: acide dicarboxy- nucleique.

ARN: acide ribonucieique.

C: carbone.

°C: degre çelsus.

CO_2 : dioxide de carbone.

°D: degre dornic.

D: dextrogyre.

g : gramme.

H: hydrogène.

H_2O: eau.

H_2O_2: eau oxygéné.

L: litre

mg: miligramme.

Mm: milimetre .

mn: minute.

P: phosphate.

Thème :

Isolement, purification, caractérisation et pré-identification de bactéries lactiques de lait cru (région de JIJEL)

Nom et Prénom des étudiantes :

- **M^elle : BENDAS SABRINA**
- **M^elle : MAOUCHE SAMIA**
- **M^elle : NACER RADIA**

Date de soutenance :

/ 09 / 2002

Résumé :

L'objectif de notre étude est l'isolement , purification , caractérisation et pré-identification des bactéries lactiques du lait cru jijilien .

Nous avons isolé dix sept (17) souches mésophiles représentées par des especes appartenant au genres : *Lactococcus* et *Lactobacillus*.

Les aptitudes technologiques étudiées montrent que les souches sont pour la majorité bonnes acidifiantes (*Lactococcus,* 7g d'acide lactique / l de lait) . à faible activité protéolytique et ne possèdent pas une aptitude texturante.

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

Mots clés :

Bactéries lactiques , Aptitudes technologiques , Interaction .

ملخص :

إن الغـرض مـن دراستنا ، هو عزل وتنقية البكتيريا اللبنية و التعرف على خصائصها إنطلاقا من حليب طازج (منطقة جيجل) . قمنا بعزل (17) سلالة معتدلة الحرارة ممثلة بأنواع تنتمي إلى جنس *Lactococcus* و *Lactobacillus* .

الخصائص التكنولوجية المدروسة تدل على أن أغلبية السلالات ذات قدرة على إنتاج حمض اللبن (*Lactococcus* ، 7غ من حمض اللبن/ل من الحليب) ، وفعالية ضعيفة لتحليل البروتينات ولا تملك خاصية النسج .

دراسة التفاعلات البكتيرية تسمح لنا بمشاهدة نتائج التحريض و التثبيط وأيضا تبين بشكل واضح إنتاج المواد المضبطة .

الكلمات المفتاح :

البكتيريا اللبنية ، الخصائص التكنولوجية ، التفاعلات .