



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

*Ministère de l'Enseignement supérieur  
et de la Recherche Scientifique*

Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

# Memoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat  
Option : Génie biologique



**Thème**



**L'étude de quelques propriétés  
technologiques et antimicrobiennes  
de *Leuconostoc* et la mise au point  
d'un fromage frais au lait de chèvre.**

Proposé par :

M<sup>elle</sup> : FERMOUS Naima  
M<sup>elle</sup> : BENYAHIA Zineb

Membres du jury :

Président: Mr SADOUN  
Promotrice: Mme FARADJI  
Examinatrice: M<sup>elle</sup> TITLLI

Soutenu le : 20-06-2012



Promotion 2011-2012



## Remerciements

*Nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force le courage et la patience pour mener à terme ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude :*

*A notre promotrice **Mme FARADJI**, pour l'honneur qui nous à fait de nous encadrer, pour ses multiples et sincères efforts, ses orientations pour mener ce travail à terme.*

*A **Mr SADOON** d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre travail.*

*A **M<sup>lle</sup> TITELLI** d'avoir accepté être parmi le jury et d'examiné notre travail.*

*A tous les enseignants qui ont contribués à notre formation de la première année à ce jour.*

*A tous nos amis qui nous ont soutenus et encouragés tout le long de ce trajet.*

*A **Mr BRAHIMI** et le technicien de laboratoire de chimie, de nous avoir permet et aider à mesurer la viscosité.*

*A tous nos collègues de laboratoire LMA, et précisément Assia et Yasmina.*



# Dédicaces Dédicaces

*Je tiens vivement, à dédier ce travail en signe de respect et de reconnaissance à vous, mes très chères parents, pour tous vos sacrifices, vos encouragements et vos soutiens toute au long de mes études ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci que Dieu vos protège!*

*A mes frères : Nassim, Zahir, Massinissa*

*Mes sœurs ; Samia, Akila, Nadia, Kahina et son époux Zahir ainsi que leur bébé qui vient en route, Nassima et son époux Sadek et ma petite chère adorable nièce : Nada.*

*A toute la famille BENYAHIA et BENSAAIDA*

*A ma copine Naima et toutes sa famille*

*Et à toute la promotion génie biologique 2011/2012*

*« Zineb »*





# *Dédicaces* *Dédicaces*

*Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :*

*Mon cher père qui a été toujours un exemple pour moi, et qui a veillé à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires.*

*Ma chère mère qui m'a appris d'être femme et qui m'a beaucoup aidé dans mes études, pour les sacrifices qu'elle a faits pour notre éducation et la confiance et l'amour qu'elle m'a toujours accordés.*

*Ma grande-mère (Zahra).*

*Mes adorables frères: Khelef, Djamel, Mohand et sa famille, M'hand et sa famille.*

*Mes adorables sœurs (Karima, Zahia et sa famille, Khokha et sa famille).*

*Mes tentes, leurs maris et leurs enfants.*

*Ma copine Zineb et sa famille.*

*A tous ceux qui m'ont soutenus et aidés pour la réalisation de ce modeste travail et tous ceux qui me sont chers.*

*\*Naima\**



## Liste des abréviations

### A

ADNr: Acide Déoxyribo Nucléique ribosomal  
ADN: Acide Déoxyribo Nucléique  
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism  
A: Consistance

### B

BN : Bouillon Nutritif

### C

°C : Degré Celsius  
CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone  
CSR : Clostridium Sulfito – Réducteurs  
CF : Coliformes Fécaux  
CT : Coliformes Totaux  
Cl : Chlor

Ca: Calcium

### D

°D : Degré Doronic

### E

*E.coli: Esherishia coli*

### F

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile  
FL : Flore Lactique

### J

J : Jour

J.O.R.A: Journale Official de la République Algérienne

H

h : Heure

H : Hydrogène

G

g ; Gramme

GN : Gélose Nutritive

GC: Guanine Cytosine

K

K: Potassium

L

*Lc.lactis: Lactococcus Lactis*

*L.m : Leuconostoc mesenteroides*

L : Litre

M

MH: Muller Hinton

MRS: Man, Rosa, Sharpe

min: Minute

ml : Millilitre

Mg: Magnésium

N

Na: Sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

N: Normalité

NPP : Nombre le Plus Probable

P

pH: potentiel Hydrogène

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

## R

rep-PCR: répétitive extragénic palindromique – Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

## S

*S.aureus* : *Staphylococcus aureus*

ssp : Sous espèce

## U

UFC : Unité Formant Colonie

## V

VF: Viande Foie

%: Pourcentage

ug : Microgramme

um : Micromètre

μl: microlitre

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les Bactéries lactiques.....	4
<b>Tableau II</b> : Principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments.....	5
<b>Tableau III</b> : La composition de lait de chèvre.....	10
<b>Tableau IV</b> : comparaison entre le lait de chèvre et de vache.....	10
<b>Tableau V</b> : Tests de vérification de la pureté des souches de <i>Leuconostoc</i> .....	15
<b>Tableau VI</b> : Les antibiotiques utilisés, leurs concentration et abréviations.....	28
<b>Tableau VII</b> : Analyse microbiologique du lait cru.....	31
<b>Tableau VIII</b> : caractères des souches lactiques.....	36
<b>Tableau IV</b> : Résultats obtenu en comparaison avec les critères microbiologiques de laits et produits laitiers.....	37
<b>Tableau X</b> : Standardisation des souches étudiées.....	39
<b>Tableau XI</b> : pH et acidité de quatre souches de bactéries lactiques cultivées dans du lait cru de chèvre.....	40
<b>Tableau XII</b> : résultats de test protéolytique.....	41
<b>Tableau XIII</b> : Résultats de test des spots.....	42
<b>Tableau XIV</b> : Diamètre des zones d'inhibition avec le test des puits.....	43
<b>Tableau XV</b> : Résultats d'antibiogramme.....	44
<b>Tableau XVI</b> : Résultats de l'analyse du lait.....	47
<b>Tableau XVII</b> : viscosités des fromages	48

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S.....	3
<b>Figure 2 :</b> Revivification et vérification de la pureté des souches test.....	14
<b>Figure 3 :</b> Standardisation des inocula des huit souches ( <i>Leuconostoc et L. lactis</i> ) de bactéries lactiques.....	16
<b>Figure 4 :</b> Méthodologie de la mesure de l'acidité du lait.....	18
<b>Figure 5 :</b> Dénombrement des coliformes fécaux dans le lait cru de chèvre.....	20
<b>Figure 6 :</b> Dénombrement des Staphylocoques dans le lait cru de chèvre.....	21
<b>Figure 7 :</b> Etude du pouvoir acidifiant.....	23
<b>Figure 8 :</b> test des spots.....	26
<b>Figure 9 :</b> test des puits.....	27
<b>Figure 10 :</b> Etude de l'activité antagoniste vis-à-vis <i>S.aureus</i> .....	29
<b>Figure 11 :</b> Etape de la mise au point d'un fromage frais a partir du lait de chèvre.....	34
<b>Photo 1 :</b> Viscosimètre.....	35
<b>Photo 2 :</b> Aspect des colonies des <i>Leuconostoc</i> .....	36
<b>Photo 3 :</b> 176 dans MRS à 2% .....	41
<b>Photo 4 :</b> 176 dans MRS à 1%.....	41
<b>Photo 5 :</b> LL dans MRS à 1%.....	41
<b>Photo 6 :</b> <i>E.coli</i> /LL.....	42
<b>Photo 7 :</b> caillé / <i>E.coli</i> .....	42
<b>Photo 8 :</b> 87/ <i>E.coli</i> .....	43
<b>Photo 9 :</b> <i>Pseudomonas</i> /caillé.....	43

<b>Photo 10</b> :176/ <i>E.coli</i> .....	43
<b>Photo 11</b> : <i>S.aureus</i> .....	45
<b>Photo12</b> : <i>L.mesenteroides</i> (176).....	45
<b>Photo 13</b> : <i>E.coli</i> .....	45
<b>Photo 14</b> : Fromages préparés.....	49
<b>Figure 12</b> : résultats de l'analyse microbiologique du lait de chèvre.....	38
<b>Figure 13</b> : Exemples de résultat de test protéolytique.....	41
<b>Figure 14</b> : Exemple de résultat de test des spots.....	42
<b>Figure 15</b> : Exemples de résultats du test des puits.....	43
<b>Figure 16</b> : Zones d'inhibition vis-à-vis des antibiotiques.....	45
<b>Figure 17</b> : Evolution de la croissance <i>L.msspcremoris</i> , <i>L.lactis</i> et <i>S.aureus</i> dans le lait de chèvre.....	46
<b>Figure 18</b> : Effet antagonisme des bactéries lactiques sur la croissance de <i>S.aureus</i> .....	46
<b>Figure 19</b> : Différentes flores recherchés dans le lait.....	47
<b>Figure 20</b> : Evolution de pH.....	50
<b>Figure 21</b> : Evolution de l'acidité Dornic.....	50
<b>Figure 22</b> : Suivis de l'évolution de la croissance des différentes souches dans les fromages préparés.....	51



# SOMMAIRE

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

## Etude Bibliographique

### Les bactéries lactiques

I-1- Définition et caractéristiques.....	2
I-2- Identification.....	2
I-3 Taxonomie et classification des bactéries lactiques.....	3
I-4- Rôle des bactéries lactiques dans les aliments.....	4
I-5- Effets probiotiques des bactéries lactiques.....	5
I-6- Exigences nutritionnelles.....	6
I-7- Les <i>Leuconostoc</i> .....	6
I-7-1- Définition et caractérisation.....	6
I-7-2- Habitat.....	7
I-7-3- Métabolismes des <i>Leuconostoc</i> .....	7
a) Fermentation des hexoses.....	7
b) Fermentation des citrates et acides carboxyliques.....	8
c) Fermentation d'autres acides carboxyliques.....	8

## **Lait cru de la chèvre**

II-1- Définition.....	10
II-2- Valeur nutritionnelle.....	10

## **Fromage frais de lait de chèvre**

III-1- Définition .....	12
III-2- Préparation .....	12
III-3- Caractéristiques.....	12

### **Etude expérimentale**

## **Chapitre I : Matériels et méthodes**

I-1- Objectif du travail.....	14
I-2- Origine des souches test.....	14
I-3- Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées.....	14
I-4- Préparation de l'inoculum standard des souches.....	15
I-5- Echantillon de lait.....	17
I-5-1- Technique de prélèvement.....	17
I-4-2- Transport et conservation du lait.....	17
I-6- l'analyse physico –chimique des échantillons de lait.....	17
1. Mesure de pH.....	17
2. Mesure de l'acidité titrable.....	17
3. Test de stabilité .....	18
a) Test de stabilité à l'ébullition.....	18
I-7- L'analyse microbiologique du lait cru de chèvre.....	19

1- Recherche et dénombrement des coliformes totaux.....	19
2- Dénombrement des coliformes fécaux.....	19
3- Recherche des Clostridium sulfito – réducteurs.....	20
4- Dénombrement des Staphylocoques.....	20
5- Dénombrement de la flore FTAM.....	21
6- Dénombrement des Enterobacters.....	22
7- Dénombrement des Streptocoques.....	22
I-8- Etude du pouvoir acidifiant des souches de bactéries lactiques.....	22
I-9- Test protéolytique.....	24
I-10- Activité antibactérienne.....	24
1-Originé des souches cibles.....	24
a) Isolement d' <i>E.coli</i> .....	24
2- Standardisation des souches pathogènes.....	25
I-10-a) Test des spots.....	25
I-10-b) Test des puits.....	26
I-11- Effet des antibiotiques sur la croissance des souches.....	27
I-12- Test d'antagonisme.....	28
1) Préparation des cultures témoins.....	29
2) Test d'antagonismes des Co-cultures (culture mixte).....	30
I-13- Essai de mise au point d'un fromage frais a partir du lait de chèvre....	30
1 - L'analyse microbiologique du lait.....	30
2 - Préparation de fromage frais .....	32
a) Préparations des préferments .....	32
b) Préparation des fromages .....	32
3- Mesure de la viscosité des fromages préparés .....	35
4- Analyse sensorielle.....	35

## Chapitre II : Résultats et discussions

II-1- Vérification de la pureté et de l'identité des souches test utilisées.....	36
II-2- Standardisation des inocula bactériens.....	36
II-3- Evaluation de la qualité hygiénique du lait de chèvre.....	37

1. Mesure du pH et de l'acidité titrable.....	37
2. Test de stabilité .....	37
a) Test de stabilité à l'ébullition .....	37
3. Analyse microbiologique du lait .....	37
II-4- Etude du pouvoir acidifiant des souches .....	39
II-5- Test protéolytique .....	40
II-6- Activité antibactérienne .....	41
1. Vérification de la pureté d'E.coli :.....	42
a) Test des spots .....	42
b) Test des puits .....	42
II-7- Effet des antibiotiques sur la croissance des souches .....	44
II-8- Etude de l'activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques .....	45
II-9- Mise au point d'un fromage frais .....	47
1. Analyse microbiologique de lait utilisé .....	47
2. Mesure de la viscosité.....	48
3. Suivi de l'évolution du pH et l'acidité Dornic dans le fromage.....	48
4. Suivis de l'évolution des bactéries lactiques et <i>S.aureus</i> dans les fromages préparés.....	50
5. Analyse sensoriel des fromages préparés.....	52
<b>Conclusion.....</b>	<b>53</b>

## Références bibliographiques

## Annexe

# INTRODUCTION

## Introduction

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels (**Ouadghiri, 2009**).

Le développement de l'industrie agro-alimentaire et en particulier l'utilisation de matières premières nouvelles comme le rétentat d'ultrafiltration, ainsi que le besoin de créer de nouveaux produits expliquent l'intérêt accru porté à ce groupe de bactéries diverses et souvent difficiles à manipuler (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés, yaourts, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation malolactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie. Les technologies laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques. Dans la fabrication fromagère, elles jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits. (**Desmazeaud, 1998**). Elles ont la capacité de fermenter les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. (**Elmoualdi et al., 2008**). Elles permettent, de part leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente. (**Badis et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps de façon consciente ou non pour leur activité antimicrobienne. (**Luquet et Corrieu, 2005**). Les leuconostocs sont utilisées en industrie laitière pour leur capacité à produire du CO<sub>2</sub> et des composés d'arôme (diacétyl et acétoïne) (*Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*) grâce au co-métabolisme du citrate et du lactose. Les produits de protéolyse contribuent aussi à la saveur des fromages. (**Zadi-Karam et al., 2011**).

Notre travail s'inscrit dans ce contexte. Il est scindé en trois parties : la première consiste à l'étude de quelques propriétés technologiques (pouvoir acidifiant, activité protéolytique, sensibilité aux antibiotiques) de 7 souches de *Leuconostoc*. Dans la deuxième partie, les souches ayant les meilleures propriétés technologiques et antimicrobiennes, est étudiée en co-culture avec une souche de référence (*Lactococcus Lactis*). La troisième partie va portée sur la fabrication du fromage du lait de chèvre.

# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## **Chapitre I : Les bactéries lactiques**

### **I-1- Définition et caractéristiques :**

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le caractère commun est la production d'acide lactique (**Labioui et al., 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, anaérobies, catalase négative, oxydase négative. Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54% (**Matamoros, 2008**). Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, et chimio-organotrophes, ont une forme de bâtonnets ou de coques, elles sont immobiles et dépourvues de nitrate réductase (**De Roissart et Luquet, 1994**). Les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**Baharak, 1999**).

Il est bien connu que les bactéries lactiques concourent à l'alimentation de l'humanité. En effet, elles jouent un rôle déterminant dans l'élaboration de nombreux produits fermentés, tels que les produits laitiers, les salaisons, la choucroute. Elles participent également à la production du pain, du café, du cacao, du vin, de l'ensilage,... etc. Leur champ d'action est donc très vaste (**Drider et Prévost, 2009**).

### **I-2- Identification :**

L'identification des bactéries lactiques est basée sur plusieurs caractères : morphologiques, physico-chimiques, immunologiques, génétiques.

La forme des cellules microbiennes représente souvent un caractère distinctif de l'espèce et de genre bactériennes, les bactéries lactiques peuvent être réparties en trois groupes ; les coques, les bâtonnets réguliers et les bâtonnets irréguliers (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Sur le plan physico-chimiques l'identification repose sur l'analyse de composants cellulaires particuliers, les protéines, ou de l'ensemble des composants cellulaires (**Ninane, 2008**). Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques. Les méthodes génotypiques utilisées pour le typage comprennent PFGE de l'ADN chromosomique digéré, ribotypage, profil plasmidique et les méthodes de typage basées sur PCR telles que les RAPD, AFLP et rep-PCR (**Ouadghiri, 2009**).

### I-3- Taxonomie et classification des bactéries lactiques :

La taxonomie des bactéries lactiques a été basée sur la possibilité de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides (Givry, 2006). La figure 1 nous présente le développement de différentes bactéries Gram positif.

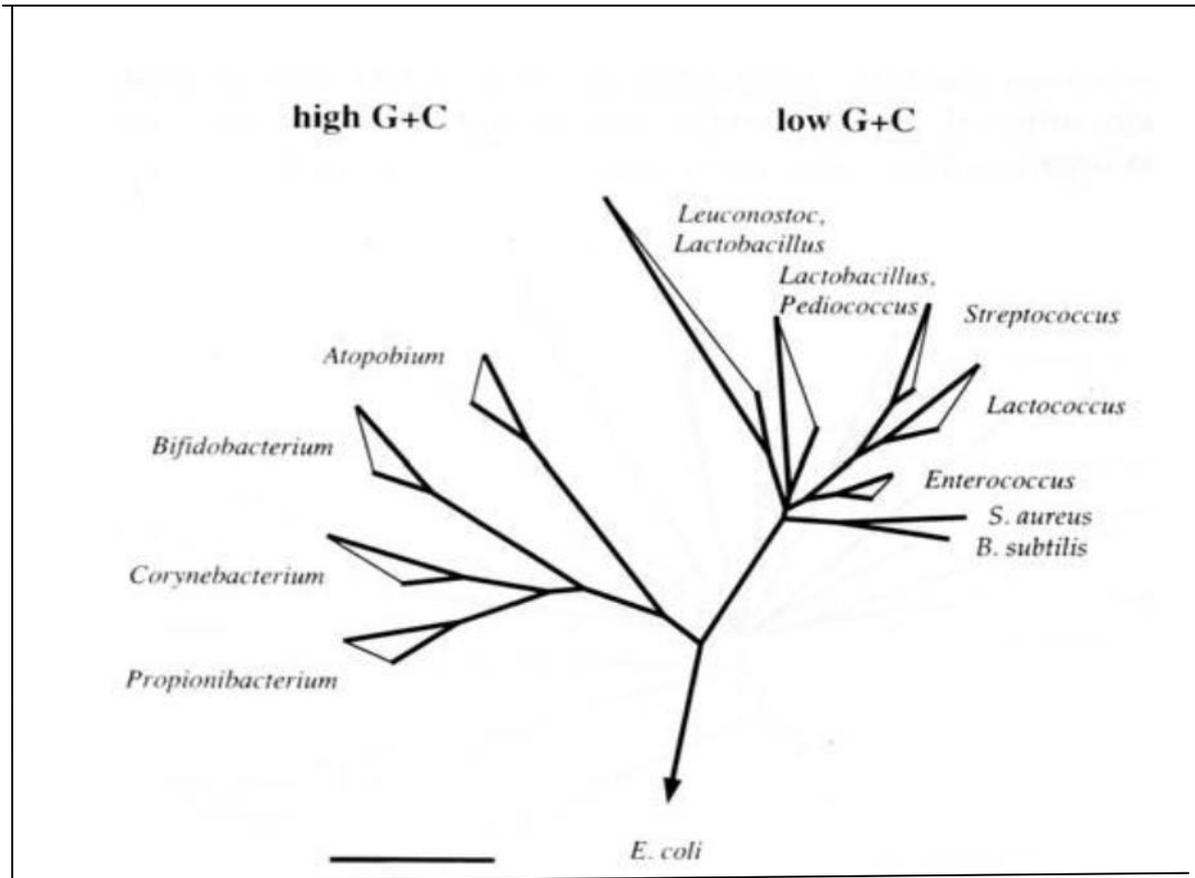


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S (Bekhouche, 2006).

Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques, ... (Nguyet Thu, 2008). Les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Dortu et Thonart, 2009).

Les bactéries lactiques sont classées suivant la nature des produits obtenus à partir des glucides : les bactéries homolactiques strictes produisent majoritairement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques facultatives forment un mélange constitué majoritairement d'acides lactique et acétique. Les bactéries hétérolactiques strictes produisent de l'éthanol ou du CO<sub>2</sub>, en plus des acides lactique et acétique (**Prioult, 1999**). Deux groupes de bactéries lactiques peuvent être définis (tableau I)

**a) Bactéries lactiques Homofermentaire :**

Sont utilisées pour l'obtention de l'acide lactique.

**b) Bactéries lactiques hétérofermentaire :**

Produisent aussi de l'acide succinique, de l'alcool, du gaz carbonique et de l'hydrogène (**Dilmi Bouras, 1991**).

**Tableau 1 : Les Bactéries lactiques (Dilmi Bouras, 1991).**

<b>Genres</b>	<b>Type de fermentation</b>	<b>Produit principale</b>
Streptocoques fécaux	Homofermentaire	Lactate
<i>Pedicoccus</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate
	heterofermentaire	lactate et acétate (1 :1)
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentaire	Lactate, CO <sub>2</sub> et acétate (1 :1 :1)
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentaire	Lactate, CO <sub>2</sub> et acétate (1 :1 :1)
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentaire	Lactate et acétate (2 :3)

**I-4- Rôle des bactéries lactiques dans les aliments :**

Les bactéries lactiques ont deux rôles principaux dans les aliments liés à leurs activités métaboliques (tableau II).

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

<b>Rôle positif (technologique)</b>	<b>Rôle négatif</b>
<p><b>Structure et texture</b></p> <p>.acidification Laits fermentés, fromage</p> <p>.polysaccharides Laits fermentés</p> <p><b>arome et saveur</b></p> <p>.acides organiques tous produits fermentés</p> <p>.diacétyle / acétaldéhyde beurre et crème/yaourt</p> <p>.lipolyse fromage</p> <p><b>conservation</b></p> <p>tous produits</p> <p>.acide organiques .bactériocines .peroxyde d'hydrogène</p> <p><b>nutrition</b></p> <p>laits fermentés</p> <p>.digestion du lactose .colonisation de l'intestin</p>	<p><b>Altération de l'aspect</b></p> <p>.polysaccharides produits carnés, vin, bière</p> <p>.CO<sub>2</sub> .peroxyde d'hydrogène produits carnés</p> <p><b>altération des qualités organoleptiques</b></p> <p>.acidification trop poussée lait cru, vin, produits carnés</p> <p>.oxydation des acides gras beurre et crème, produits carnés</p> <p>.protéolyse : peptides amers fromage</p> <p><b>production de composés toxiques</b></p> <p>.amines (tyramine) produits carnés</p>

### **I-5- Effets probiotiques des bactéries lactiques:**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé en 1907, par le russe Metchnikoff. Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la

putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie. Plus récemment, des études de type pharmaceutique ont été menées à grande échelle dans plusieurs laboratoires afin de démontrer l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé. Seul un petit nombre de bactéries lactiques dont on trouve *Enterococcus faecium* ainsi que les bifidobactéries, a été ainsi étudié. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs. Les bactéries lactiques pour lesquelles ces effets sont décrits sont appelées probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants, qui après ingestion, exercent des effets bénéfiques sur la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de l'aliment **(Drouault et Corthier, 2000)**.

#### **I-6- Exigences nutritionnelles :**

Les bactéries lactiques constituent un groupe de microorganismes particulièrement exigeants, en effet, outre la présence d'un sucre fermentescible. Elles ont également besoin pour se développer, de plusieurs acides aminés, vitamines et d'un système tampon capable de neutraliser les quantités élevées d'acides produites pendant la croissance, Ces différents éléments ne peuvent être fournis que par des milieux très complexes, Le milieu qui contient 20 g de glucose et près de 25 g de sources protéiques complexes (sous la forme d'extrait de viande, extrait de levure et d'hydrolysate de caséine), est un milieu qui permet la croissance de l'ensemble des bactéries lactiques **(Giraud, 1993)**.

#### **I-7- Les *Leuconostoc* :**

##### **I-7-1- Définition et caractérisation :**

Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878. Le terme *Leuconostoc* vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse et de *leuco* qui veut dire blanc. Les *Leuconostoc* sont apparus à l'origine sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans des sucreries. Or les *Leuconostoc* responsables de ces accidents produisent des dextrans et en milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique: Gaine qui rappelle celle des *Nostocs* **(Devoyod et Poullain, 1988)**. Les *Leuconostocs* constituent un vaste groupe de bactéries lactiques dont la taxonomie est

régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires. Leur importance en industrie alimentaire est considérable puisqu'elles interviennent dans une large gamme de produits comme flore technologique. Ces bactéries se caractérisent par la capacité de produire de CO<sub>2</sub> et d'éthanol avec la capacité de certaines espèces à fermenter les sucres et le citrate. Autres espèces synthétisent du dextrane en présence de saccharose et produisent aussi des substances inhibitrices (**Nehal et Dilmi Bouras, 2010**). Par aspect microbiologiques les *Leuconostoc* sont généralement des cellules sphériques ou ovoïdes (de 0,4 à 0,5 µm) en paires ou en chaîne (**Bianchi-Salvadori, 2006**). Sont des germes hétérofermentaires (**Dieng, 2001**).

### **I-7-2- Habitat:**

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (**Bekhouche, 2006**).

Ils peuvent exister aussi sur les fourrages verts ou secs, céréales (jusqu'à 10<sup>6</sup> germes /g d'herbe fraîche), poussières, matériel de traite et de fromagerie (**Jacky et al., 2004**)

Les *Leuconostoc* sont habituellement rencontrés sur le vin. Leur présence intervient dans le goût, et l'arôme du lait est dû à la production de certains composés aromatiques comme l'acétoïne et le diacétyl. Selon **Adiv** (2004) on peut aussi retrouver des espèces du genre *Leuconostoc* dans la cavité buccale et dans le tube digestif de l'homme ou des animaux. Ces bactéries sont également connues dans les industries alimentaires.

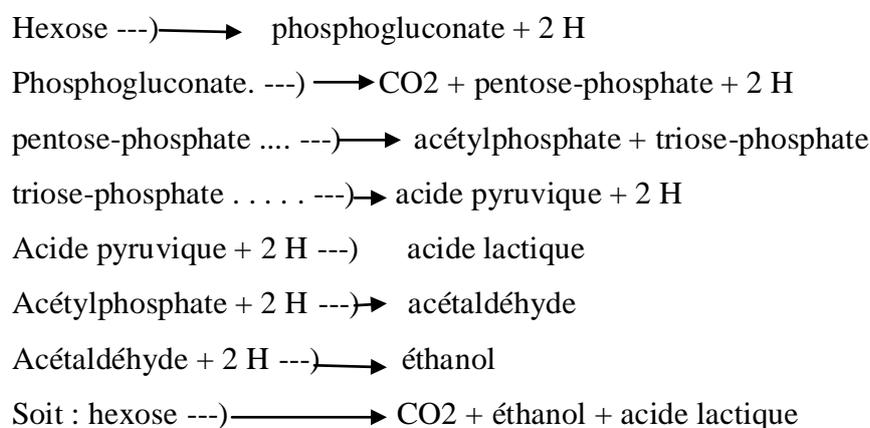
### **I-7-3- Métabolismes des *Leuconostoc* :**

Les leuconostocs sont des bactéries lactiques capables de produire du CO<sub>2</sub> et des composés d'arôme (diacétyl et acétoïne) (*Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*) grâce au co-métabolisme du citrate et du lactose. Les produits de protéolyse contribuent aussi à la saveur des fromages (**Zadi-Karam et al., 2011**).

#### **a) Fermentation des hexoses :**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose. Trois voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'Etner Doudoroff et la voie des hexoses

monophosphates. Les *Leuconostoc* fermentent le glucose en utilisant cette troisième possibilité. Ils clivent le xylose-5-phosphate en acétyl-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate par action de la phosphocétolase. Les *Leuconostoc* ne peuvent pas décarboxyler directement, comme certains microorganismes, le pyruvate en acétaldéhyde car ils ne possèdent pas de pyruvate décarboxylase. La réduction de l'acétate et de l'acétaldéhyde est l'un des mécanismes principaux de la réoxydation de pyridine nucléotide réduite chez *L. mesenteroides*. Cette espèce possède deux alcool-déshydrogénases. Compte tenu des études effectuées sur *L. mesenteroides* ou *L. dextranicum*, il est possible de donner le schéma simplifié suivant de la fermentation des hexoses par les *Leuconostoc* :



L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostoc* par voie oxydative. Les cultures aérées de *Leuconostoc* croissent plus vite et produisent plus de biomasse, aux dépens du glucose et d'autres sucres, que les cultures non aérées. Ces dernières ne produisent que peu ou pas d'acétate (**Devoyod et Poullain, 1988**).

#### **b) Fermentation des citrates et acides carboxyliques :**

Ils ne peuvent le métaboliser qu'en présence d'un sucre fermentescible.

La pénétration du citrate dans la cellule fait intervenir une citrateperméase active à pH inférieur à 6. A l'intérieur de la cellule, le citrate est clivé en acétate et en oxaloacétate par action d'un citrate lyase ou citritase. L'activité de citrate lyase chez *Leuconostoc lactis* augmente en même temps que la croissance cellulaire se développe et n'est décelable que dans des cultures se multipliant en présence de citrate (**Devoyod et Poullain, 1988**).

#### **c) Fermentation d'autres acides carboxyliques :**

Il est montré que *L. oenos* et *L. mesenteroides* étaient capables de métaboliser plusieurs acides carboxyliques: fumarate, gluconate, malate, 2-oxoglutarate et pyruvate. Ce dernier

acide est métabolisé sans formation de diacétylène ou d'acétoïne comme le fait *L.cremoris*. La transformation de l'acide malique en L(+)-lactate et CO<sub>2</sub> (fermentation malolactique) est importante en oenologie. Si *L.mesenteroides* possède bien une enzyme malolactique, son rôle pratique se trouve restreint du fait que ce microorganisme ne se développe pas, comme *L.oenos*, à bas pH et en présence d'éthanol (**Devoyod et Poullain, 1988**).

## Chapitre II : Lait cru de chèvre

### II-1- Définition :

Le lait de chèvre est un aliment de grande importance à l'échelle mondiale (Wehrmüller et Ryffel, 2007). C'est un liquide blanc composé de lipides en émulsion sous forme de globules, de caséine en suspension colloïdale, de protéines du sérum en solution colloïdale, de lactose et de minéraux en solution. Comparé au lait de vache, il est légèrement plus blanc (Avalos De la Cruz, 2007).

### II-2- Valeur nutritionnelle

La composition nutritionnelle du lait de chèvre est influencée par différents facteurs : saison, stade de lactation, race, génétique, alimentation, facteurs environnementaux, Tableau III (Yvette, 2007)

**Tableau III : La composition de lait de chèvre (Thiebaut, 2004).**

Eau	Matières grasses	Glucides	Protéines	Vitamines	Cendres
88%	Phospholipides Triglycérides Diglycérides Monoglycérides AG libres Cérébrosides Stérols	Lactose	Lactoglobuline Protéose-peptone Lactoglobuline Albumine Iminnuglobuline Caséine	A B C B1 B2 B6 B12	Cl Ca Ph Mg Na K

Le lait de chèvre et les produits qu'il permet de fabriquer possèdent de nombreuses propriétés intéressantes (Barth et al., 2010). Le tableau suivant nous indique sur la différence entre le lait de chèvre et celui de vache.

**Tableau IV : comparaison entre le lait de chèvre et de vache (Zeller, 2005).**

Composants chimiques	Lait de vache (g/L)	Lait de chèvre (g/L)
Eau	900	900
Matière protéique	32	30.8

Lactose	48	48
Calcium	1.25	1.25
Phosphore	0.95	0.95
Matière grasse	40.4	34.4

Le lait de chèvre est plus digeste que le lait de vaches et de haute teneur en Calcium, Phosphore et vitamine A (**Corcy, 1991**). Il est meilleur pour la santé que le lait de vache, les personnes qui ont du mal à digérer certaines aliments apprécient particulièrement la bonne digestibilité de lait de chèvre, vu la taille moyenne des particules de graisses qui offre une surface de contact accru pour les enzymes, d'autre part, il contient plus d'acides gras à courte ou moyenne chaîne que le lait de vache. Or, plus la teneur en ces acides gras est élevé, meilleure est la digestibilité de la matière grasse (**Walter et al., 2010**).

## **Chapitre III : Fromage frais au lait de chèvre.**

### **III-1- Définition :**

Les fromages de chèvre sont essentiellement soit des pâtes molles à croûte naturelle ou fleurie, soit des pâtes fraîches (Merigaud et al., 2009).

Fromage de chèvre ou Bleu de chèvre, dénominations réservées aux fromages de formes et poids variables préparés exclusivement avec du lait de chèvre (Luquet et al., 1990).

### **III-2- Préparation :**

La technique de fabrication repose sur une coagulation longue du lait par action combinée de l'acidification et d'une faible quantité de présure. La température du lait, et par la suite du caillé, favorisera le développement des bactéries lactiques et aromatiques et limitera la cohésion du coagulum (Eck et al., 1987).

La préparation d'un fromage frais suit ces étapes ; réception du lait cru, son stockage provisoire, sa filtration sur un double filtre domestique pour en débarrasser des particules indésirables (poils, débris des aliments...) Vient ensuite, le traitement thermique qui diffère selon le barème appliqué ; deux coopératives se limitent à une simple thermisation de 25°C à 37°C, la troisième opte pour un flash pasteurisation de 75°C/5 secondes. Suivi d'un emprésurage, et on laisse la coagulation se poursuivre dans des cuvettes en plastiques ou en inox. Le moulage est pratiqué en prenant à partir des cuvettes de coagulation des quantités variables du coagulum, afin de les mettre dans des moules, cubiques ou circulaires couvertes ou non par du tissu ou des foncets, disposées sur une table d'égouttage. L'égouttage, caractérisé par la favorisation de la perte en masse du gel emprisonné dans les moules. Quand au salage, il est appliqué selon la demande des clients ; le sel iodé utilisé est incorporé à des doses très faibles. Et dans des emballages en cellophane, ou en papier alimentaire, le fromage est conditionné et stocké à froid, maximum 7 jours, avant d'être commercialisé (Nouffia et al., 2011).

### **III-3- Caractéristiques :**

Les produits au lait de chèvre suscitent l'intérêt des consommateurs non seulement en raison de leur goût caractéristique, mais aussi de leurs propriétés nutritives particulières. (Wehrmüller et Ryffel, 2007).

Les fromages de chèvre ont toujours occupé une place particulière dans le paysage fromager en raison de leur diversité (près d'une centaine de variétés recensées), de leur origines régionales très anciennes, de leurs traditions de fabrication liées à de véritables savoirs et, enfin, de la volonté des professionnels de les protéger à l'aide des outils techniques et juridiques existants (**Le jaouen, 2004**).

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Le travail est réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), équipe de Microbiologie du lait et des probiotiques.**

### I-1- Objectif du travail:

L'objectif de notre travail a porté sur l'étude de quelques propriétés technologiques et antimicrobiennes des *Leuconostoc* (le pH, la quantité d'acide produite, pouvoir protéolytique et la sensibilité aux antibiotiques) afin de pouvoir sélectionner des souches de *Leuconostoc* possédant des caractéristiques technologiques importantes et pouvant servir comme ferments dans la fabrication de fromages.

### I-2- Origine des souches test:

Les sept souches de *Leuconostoc mesenteroides* (A, B, C, D, E, F : ssp: *mesenteroides*, et 87 ssp: *cremoris*) utilisées dans cette étude font partie de la collection de souches du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (laboratoire de microbiologie de lait et des probiotiques) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa. Elles ont été isolées à partir du lait cru de chèvre et identifiées par Mme FARADJI puis conservées sur gélose MRS à 4°C. Une souche de référence "*Lactococcus lactis*" a été utilisée en co-culture.

### I-3- Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées:

Les huit souches de bactéries lactiques (sept souches de *Leuconostoc mesenteroides* + une souche de *Lactococcus lactis*) ont été repiquées dans 9ml de bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 24 (Figure 2).

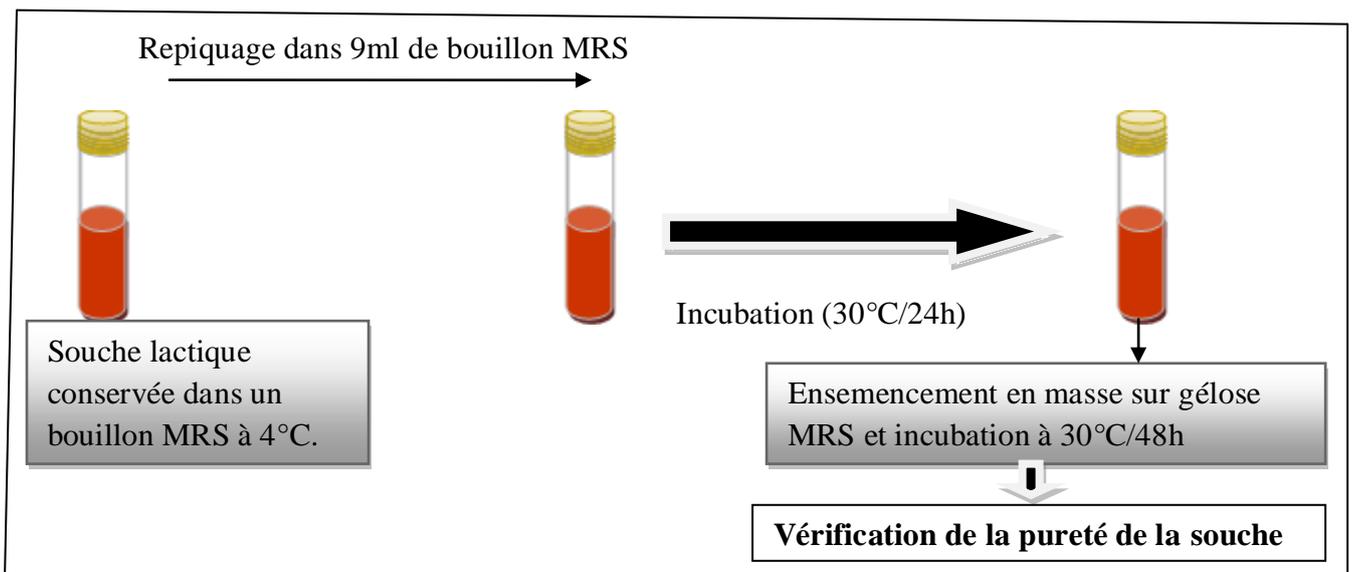


Figure 2 : Revivification et vérification de la pureté des souches test.

La pureté des souches est confirmée par des tests morphologiques et physiologiques inspirés du **Guiraud (2003)**. Ces différents tests sont résumés dans le tableau V.

**Tableau V : Tests de vérification de la pureté des souches de *Leuconostoc*.**

Test	Mode opératoire
Aspect des colonies	Observation directe sur la gélose MRS.
Aspect des cellules	Observation de la morphologie des cellules à l'aide d'un microscope.
Mode de regroupement	Observation à l'aide d'un microscope.
Gram	Coloration de Gram.
catalase	Une colonie + une goutte d'eau oxygénée
mobilité	observations microscopiques à l'état frais

#### **I-4- Standardisation des souches:**

Afin de pouvoir étudier quelques propriétés technologiques et antimicrobiennes des huit souches de bactéries lactiques (7 souches de *Leuconostoc* et une de *Lactococcus lactis*), une standardisation de l'inoculum est indispensable.

Les inoculum des huit souches de bactéries lactiques sont revivifiés par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 30°C pendant 48 h, dix colonies bien isolées de chaque souche sont repiquées à chaque fois dans 10 ml du bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18 h.

Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1 ml de chaque dilution ( $10^{-7}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ) est ensemencé en masse dans une gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48 h à l'aide d'un compteur de colonies (suntex colony, counter 570). La figure (3) récapitule les étapes de la standardisation des huit souches de bactéries lactiques sur milieu gélosé.

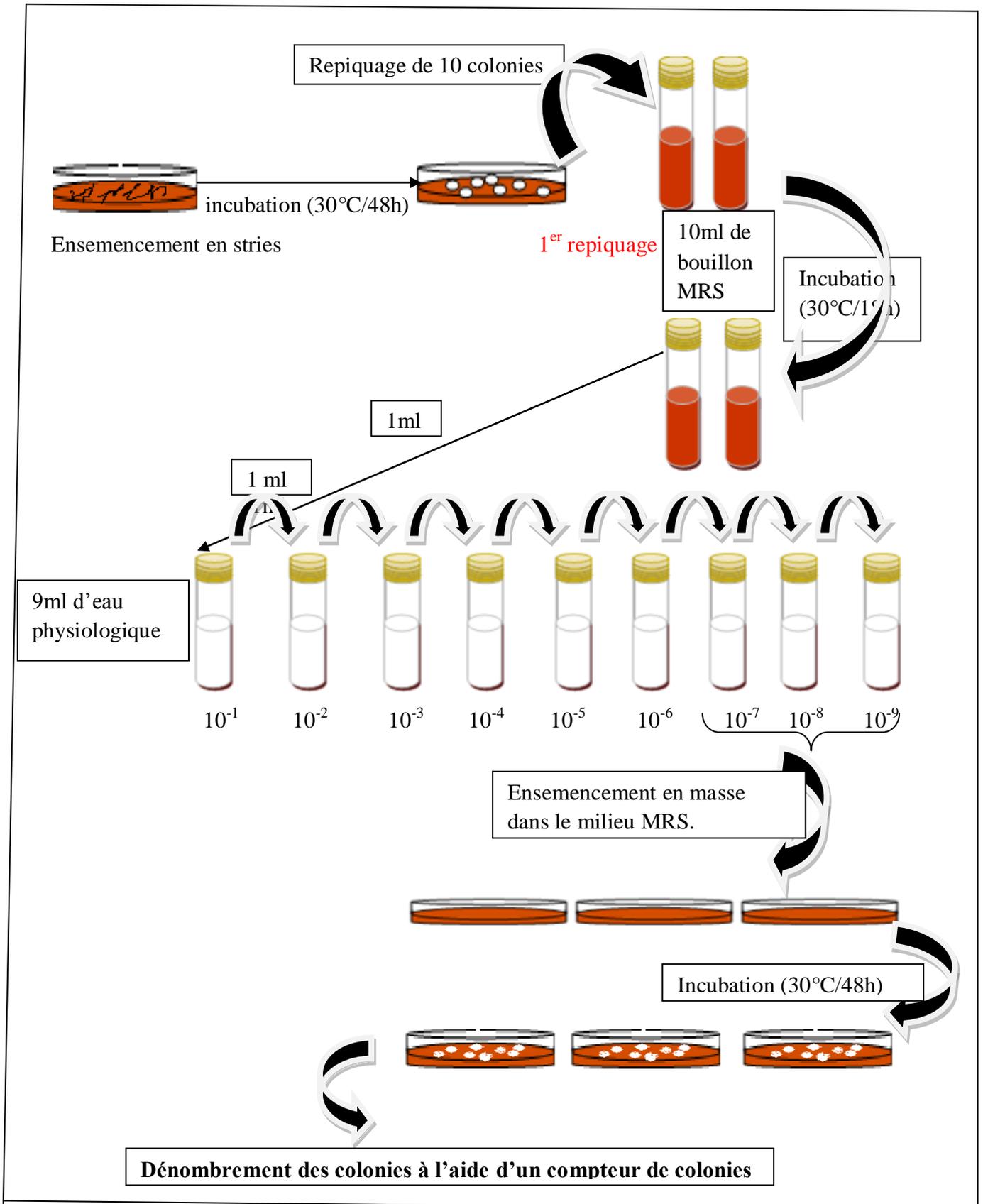


Figure 3 : Standardisation des inocula des huit souches (*Leuconostoc* et *Lc.lactis*) de bactéries lactiques.

## **I-5- Echantillon de lait:**

Le lait utilisé dans cette étude est un lait de chèvre, provenant de la région de Tardam et Ait Oussalah, de la commune de Toudja, Wilaya de Bejaia. L'alimentation des chèvres se résume à la consommation de différentes herbes du fourrage.

### **I-5-1) Technique de prélèvement:**

Au moment de la traite, les mains de manipulateur ainsi que les mamelles et la peau des trayons ont été bien nettoyés. Le prélèvement se fait directement au pis des mamelles de la chèvre dans un flacon préalablement stérilisé. Les premiers jets sont éliminés, les autres sont recueillis aseptiquement dans un flacon stérile (**Guiraud, 1980**).

Un total de trois prélèvements de lait cru ont été effectués.

### **I-5-2) Transport et conservation du lait:**

Les prélèvements ont été réalisés le matin. L'acheminement des échantillons au laboratoire a été fait dans une glacière. Le temps maximal entre le prélèvement et l'analyse des échantillons ne dépassait pas trois heures.

## **I-6- Analyse physico –chimique des échantillons de lait:**

### **1. Mesure de pH:**

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes et dans l'orientation des fermentations (**Belbis, 2007**).

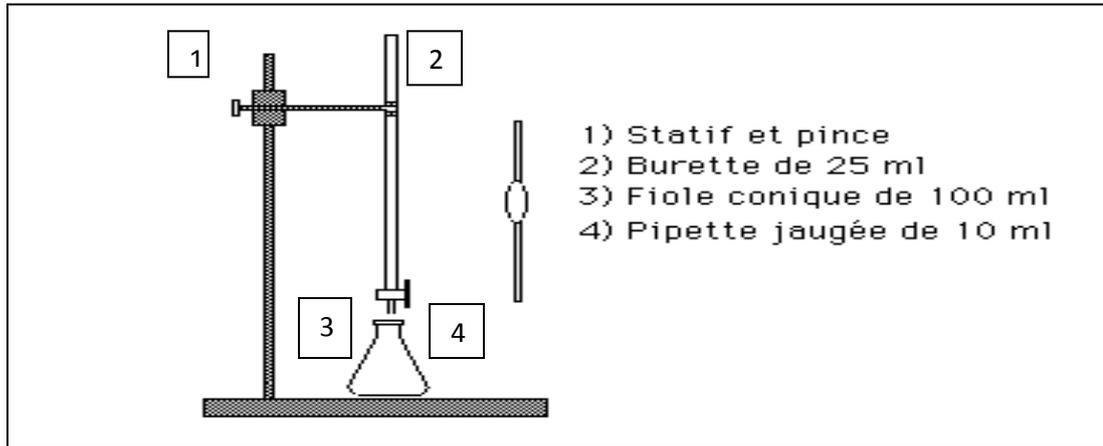
L'évaluation de l'acidité ou l'alcalinité du lait se fait par mesure directe du pH du lait à l'aide d'un pH-mètre (Hanna 210, électrode en verre). La mesure a été prise après une attente de deux minutes afin de permettre la stabilisation de l'électrode (**Bull et al., 2009**).

### **2. Mesure de l'acidité titrable:**

L'acidité Dornic est mesurée par la neutralisation de 10 ml de lait, par l'hydroxyde de sodium (NaOH N/9), en présence d'un indicateur de pH, la phénolphtaléine (0,1% dans l'alcool à 95°). Le mélange est titré jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistante au moins 10

secondes (figure 4). L'acidité du lait est exprimé comme suit :  $1^{\circ}\text{D}$  correspond à 0,1 ml de NaOH N/9 équivaut 0,1g d'acide lactique par litre de lait (Kanoun, 2006).

Nombre de dixièmes de millilitre de NaOH =  $^{\circ}\text{D}$  (Jean et al., 2002).



**Figure 4 : Méthodologie de la mesure de l'acidité du lait**

L'acidité en degré Dornic est égale :  $\text{Acidité} = V \times 10 (^{\circ}\text{D})$

V : Volume (en ml) de la chute de la burette

### 3. Test de stabilité :

#### a) Test de stabilité à l'ébullition :

Il renseigne sur l'aptitude des laits à résister à un traitement thermique.

- **principe**

Un développement microbien provoque des altérations dans le lait, cela peut être mis en évidence par l'ébullition qui entraîne une coagulation par un chauffage à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes.

- **Mode opératoire**

-Mettre 5ml de chaque échantillon de lait séparément dans un tube à essai,

-Porter le tube au bain marie (thermostater à  $100^{\circ}\text{C}$ ) pendant 5 minutes.

\* Un dosage d'acide gras, protéines et lactose au niveau de Candia par M<sup>elle</sup> HAMICCHE et BAOUCHE.

## **I-7- Analyse microbiologique du lait cru de chèvre:**

L'analyse microbiologique des produits alimentaires est indispensable pour :

- Assurer aux produits une bonne qualité et une bonne conservation,
- Assurer la garantie hygiénique et la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes et des toxines microbiennes.
- Evaluer la qualité hygiénique (**Guiraud, 2003**).

L'analyse microbiologique des échantillons de laits crus a été portée sur le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM), les coliformes totaux et fécaux, les Staphylocoques, les Enterobacteries, Clostridium Sulfito-réducteurs et les Streptocoques totaux et fécaux.

Les échantillons du lait ont été agités soigneusement afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes; il faut éviter la formation de mousse.

L'ensemencement a été réalisé en masse, en déposant 1ml de la dilution choisie dans une boîte de Pétri, ensuite 15ml de gélose en surfusion correspondant à chaque flore bactérienne sont coulés respectivement dans des boîtes de Pétri, puis bien homogénéiser. Les boîtes sont incubées aux températures correspondant à chaque flore étudiée.

### **1- Recherche et dénombrement des coliformes totaux:**

Tout d'abord on prépare les dilutions décimales à partir de la solution mère en ensementant 1 ml de lait dans 9ml de l'eau physiologique, homogénéisation, puis préparation des dilutions.

Cette numération a été réalisée par la méthode de culture sur milieu liquide (NPP). Une série de trois tubes de bouillon BCPL est ensementée à chaque fois par la solution mère ou une de ses dilutions. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48h.

### **2- Dénombrement des coliformes fécaux:**

Un ensemencement en masse à raison de deux boîtes par dilution (préparées à partir de la solution mère ( $10^{-1}$  et  $10^{-3}$ ), est réalisé avec le milieu EMB en surfusion. Au terme d'une incubation à 44°C/24h des dénombrements sont réalisés ainsi qu'une observation microscopique (figure 5).

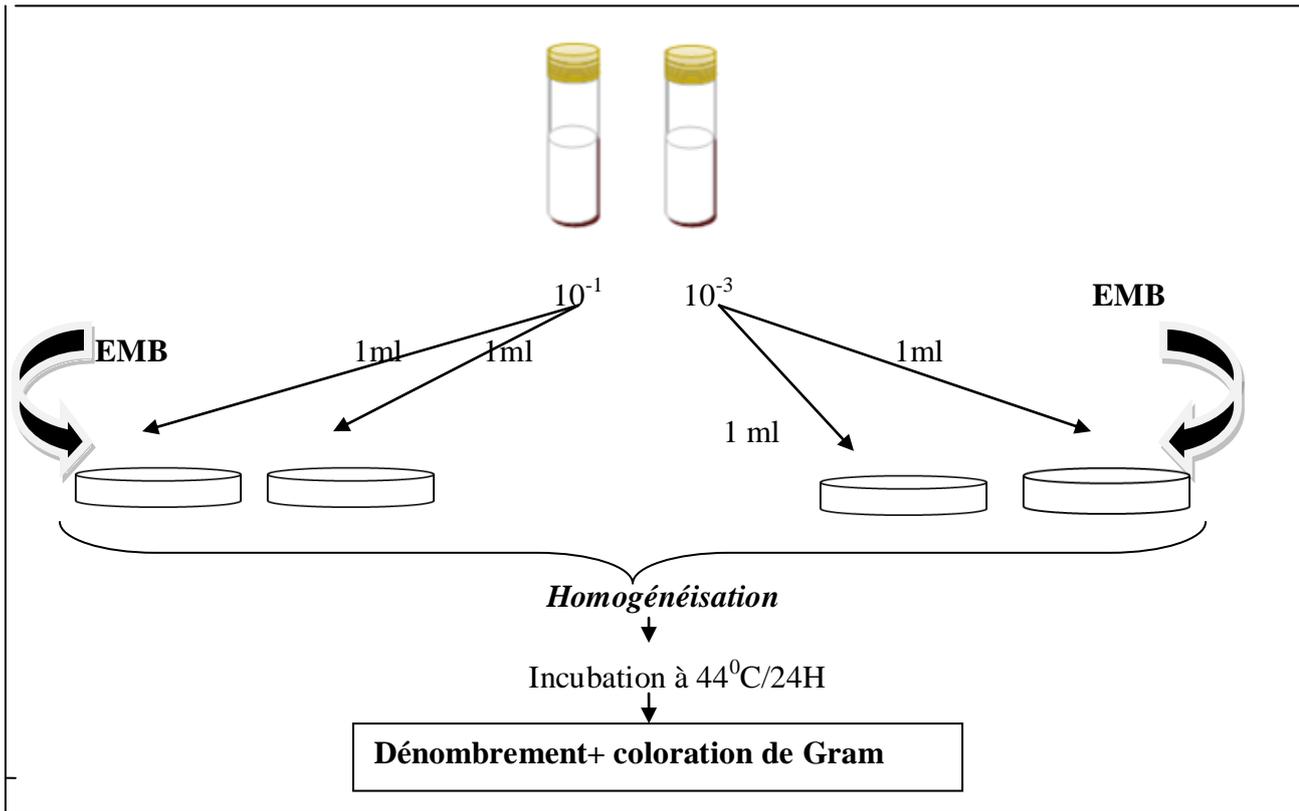


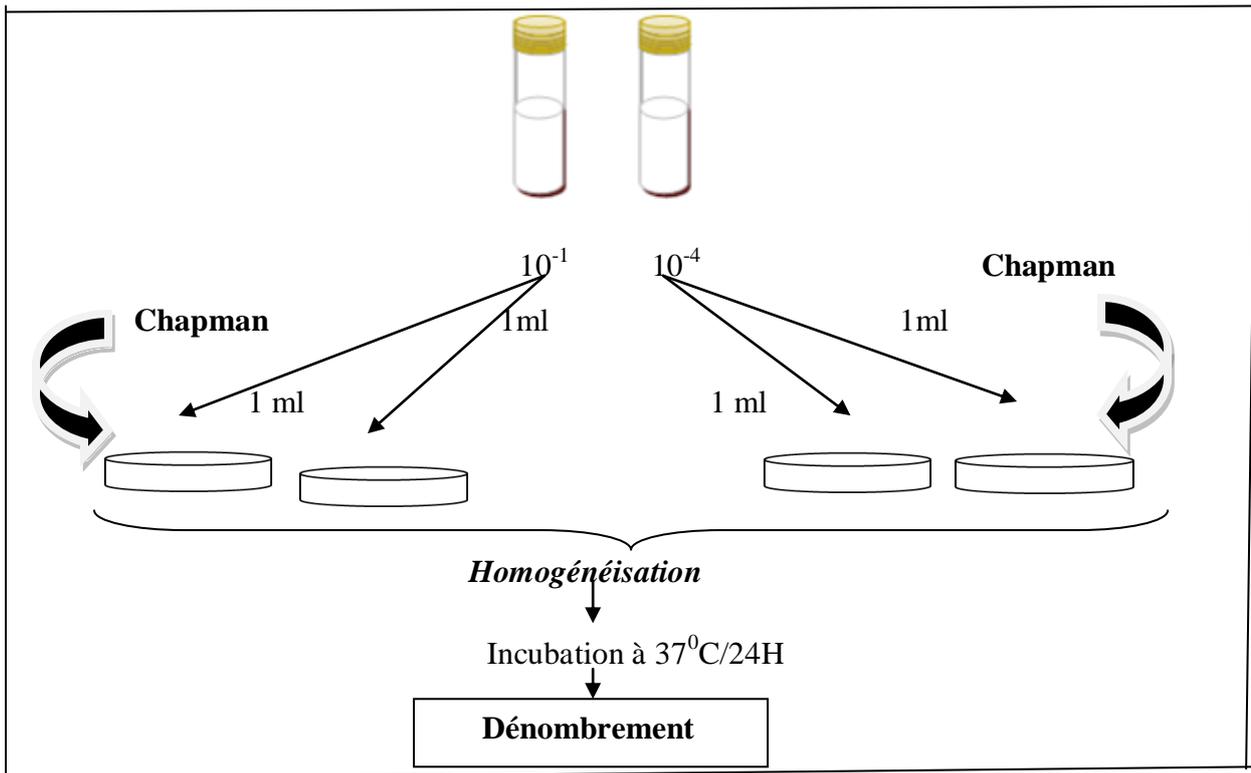
Figure 5 : Dénombrement des coliformes fécaux dans le lait cru de chèvre.

### 3- Recherche des Clostridium sulfito – réducteurs:

Un tube de 20 ml de la solution mère est mis au bain marie (Raypa) pendant 10 minutes à 80°C, pour détruire les formes végétatives. Après un refroidissement rapide (choque thermique), 1ml de cette solution est introduit dans un tube à essai, dans le quel le milieu VF additionné de sulfite de sodium et d'alun de fer est coulé. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 48h (Novello, 2003).

### 4- Dénombrement des Staphylocoques:

Le dénombrement des Staphylocoques est réalisé par un ensemencement en masse dans la gélose chapman à raison de deux boites par dilutions ( $10^{-1}$  et  $10^{-4}$ ), L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h (figure 6).



**Figure 6: Dénombrement des Staphylocoques dans le lait cru de chèvre.**

### 5- Dénombrement de la flore FTAM :

Une série de deux boîtes est ensemencée en masse à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ ). La FTAM a été dénombrée sur gélose PCA après 72h d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ .

La norme FIL100 préconise l'exploitation des résultats de la manière suivante (**Guiraud, 2003**) :

On retient les boîtes contenant 10 à 300 colonies.

On calcule le nombre de microorganismes à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3 + \dots n_x) d}$$

$\sum C$  : somme des colonies de toutes les boîtes

D : la première dilution positive.

$n_1$  : Nombre de boîtes positives de la première dilution positive.

$n_2$  : Nombre de boites positives de la deuxième dilution positive.

⋮

$n_x$  : Nombre de boites positives de la  $n^{\text{ième}}$  dilution positive.

### **6- Dénombrement des Enterobacteries:**

Une série de deux boites estensemencée en masse à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ). Les Enterobacteries ont été dénombrés sur gélose EMB après 24h d'incubation à 37°C (Novello, 2003).

### **7- Dénombrement des Streptocoques fécaux:**

La numération des Streptocoques est réalisée avec la méthode de culture sur milieu liquide (méthode de NPP), une série de deux tubes de milieu Rothe estensemencée à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ ). Les tubes sont incubés à 37°C/24h (Novello, 2003). La confirmation des streptocoques fécaux est réalisée par un ensemencement de deux tubes d'Eva- letzki par un tube positif de Rothe (trouble).

### **- Stérilisation du lait :**

Le lait cru de chèvre présentant une meilleure qualité microbiologique et hygiénique est répartie dans des flacons propres à raison de 100 ml par flacon. Ces derniers sont portés à 100 °C pendant 10min (Luquet et al., 1990) au bain-marie (Raypa). Le lait ainsi stérilisé est conservé pour une utilisation antérieure.

### **I-8- Etude du pouvoir acidifiant des souches de bactéries lactiques :**

L'activité acidifiante des bactéries lactiques représente leur principale activité métabolique et qui dépend directement de leur croissance. La façon la plus indiquée pour la mesure d'acidité consiste à suivre d'une part, l'évolution du pH des cultures au cours du temps et d'autre part, à doser simultanément l'acidité Dornic par la soude NaOH N/9 (Gourgaude et al., 1997).

La mesure du pouvoir acidifiant est réalisée dans du lait cru stérilisé dont l'acidité initiale est mesurée au moment de l'ensemencement c'est-à-dire à 0h.

Pour réaliser cette étude, on ensemence 10 colonies bien isolées et bien distinctes de chaque souche de bactérie lactique dans un tube stérile contenant 10ml du lait préalablement stérilisé, après incubation de ces tubes à 30°C/18h (préferment), 1ml de chaque préferment est ensemencé dans un tube contenant 9ml du lait, plusieurs séries sont ainsi préparées. L'incubation est réalisée à 30°C. Des dénombrements sont réalisés chaque 2h (2h, 4h, 6h et 8h) et après 24h puis 48h d'incubation (figure 7). Au terme de cette étude les souches présentant le meilleur pouvoir acidifiant seront sélectionnées pour le reste de l'étude.

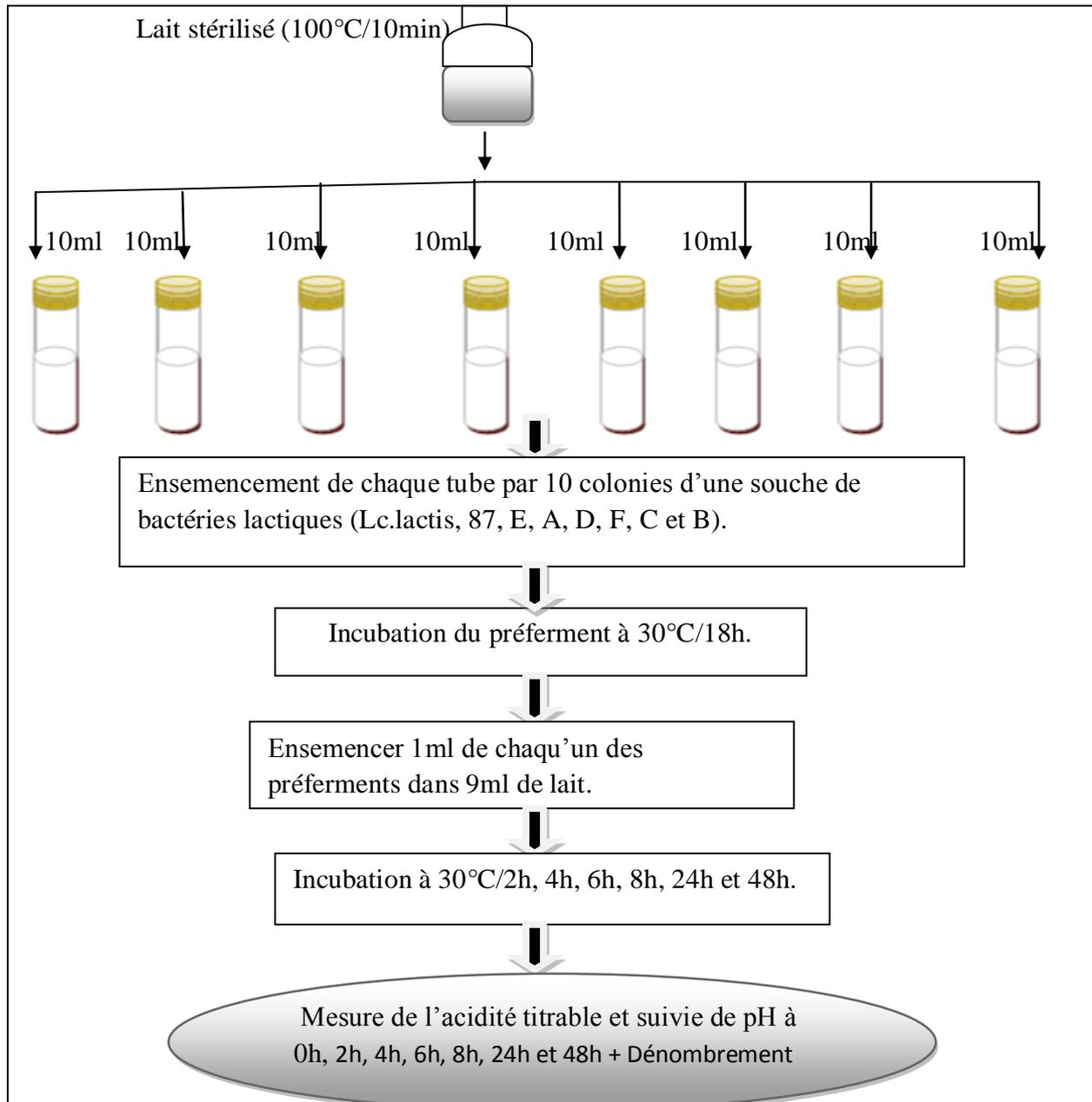


Figure 7 : Etude du pouvoir acidifiant

### **I-9- Test protéolytique :**

Afin d'évaluer l'activité protéolytique des huit souches lactiques utilisées, des cultures fraîches de 18h de ces dernières ont été préparées. 5ul de la culture fraîche de chaque souche ont été déposés en spot sur des géloses MRS préparé à 1% de lait écrémé et à 2% (annexe). En parallèle un milieu de gélose MRS à base de 10% de lait écrémé préalablement ensemencée en surface par écouvillon par une des cultures fraîches des huit souches de bactéries lactiques.

Au terme d'une incubation à 30°C pendant 24h, les zones protéolytiques ont été mesurées.

### **I-10- Activité antibactérienne :**

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi-solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible (*Labioui et al.,2005*).

#### **1- Origine des souches cibles :**

Trois souches pathogènes ont été utilisées dans cette étude ; *E.coli*, *Pseudomonas* et *Stapylococcus aureus*.

La souche de *Pseudomonas* et *Stapylococcus aureus* font partie de la collection de souches du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (laboratoire de microbiologie de lait et des probiotiques) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa, elles ont été isolées à partir du lait cru puis conservée sur gélose nutritive à 4°C. La souche d'*E.coli* a été isolée pendant ce travail.

#### **a) Isolement d'*E.coli* :**

*E.coli* a été isolée à partir d'un échantillon de lait cru de chèvre sur une boîte de Pétri ensemencée en masse avec 1ml de la dilution  $10^{-1}$  inoculé par le milieu gélosé (EMB), après incubation à 44°C/24h. Une colonie bien distincte est ensuite ensemencée à chaque fois dans un tube à essai contenant le milieu BCPL+ cloche. Après incubation à 44°C/48h, les résultats ont été notés et des observations microscopiques ont été réalisées (coloration de Gram) ainsi qu'un test à la catalase.

## 2- Standardisation des souches pathogènes :

A partir d'une culture fraîche obtenue dans 10 ml de bouillon nutritif, un ensemencement est réalisé sur gélose Nutritive. Après incubation à 37°C/48h, 3 colonies bien isolées et bien distinctes ont été repiquées dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubées à 37°C/18h.

Au terme de l'incubation, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-9}$  ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile.

A partir des dilutions  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ , 1 ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans une gélose nutritive à raison de deux boîtes de Pétri par dilution, puis incubées à 37°C/48h.

Au terme de l'incubation un dénombrement des colonies est réalisé avec un compteur de colonie (Suntex 570).

### I-10-A) Test des spots:

Les souches de bactéries lactiques (*Lc.lactis*, B, A et 87) ont été testées pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis les trois souches pathogènes (*E.coli*, *Pseudomonas* et *Stapylococcus aureus*) suivant ce protocole:

Après avoir coulé les boîtes de pétri avec 15 ml du milieu MRS en surfusion et après solidification, on dépose séparément 5ul de la culture fraîche (incubée à 30°C/18h) de chaque souche lactique préalablement en spot. Les boîtes sont séchées à température ambiante, puis on les incube à 30°C. Après 18h, la gélose est recouverte de 1ml de la culture fraîche de la souche pathogène (*E.coli*, *Pseudomonas* et *S.aureus*) à un taux de  $10^7$  UFC /ml, additionnée avec 9ml de gélose nutritive fondue en surfusion, et après incubation à 37°C pendant 24h, on mesure les zones d'inhibitions (figure 8).

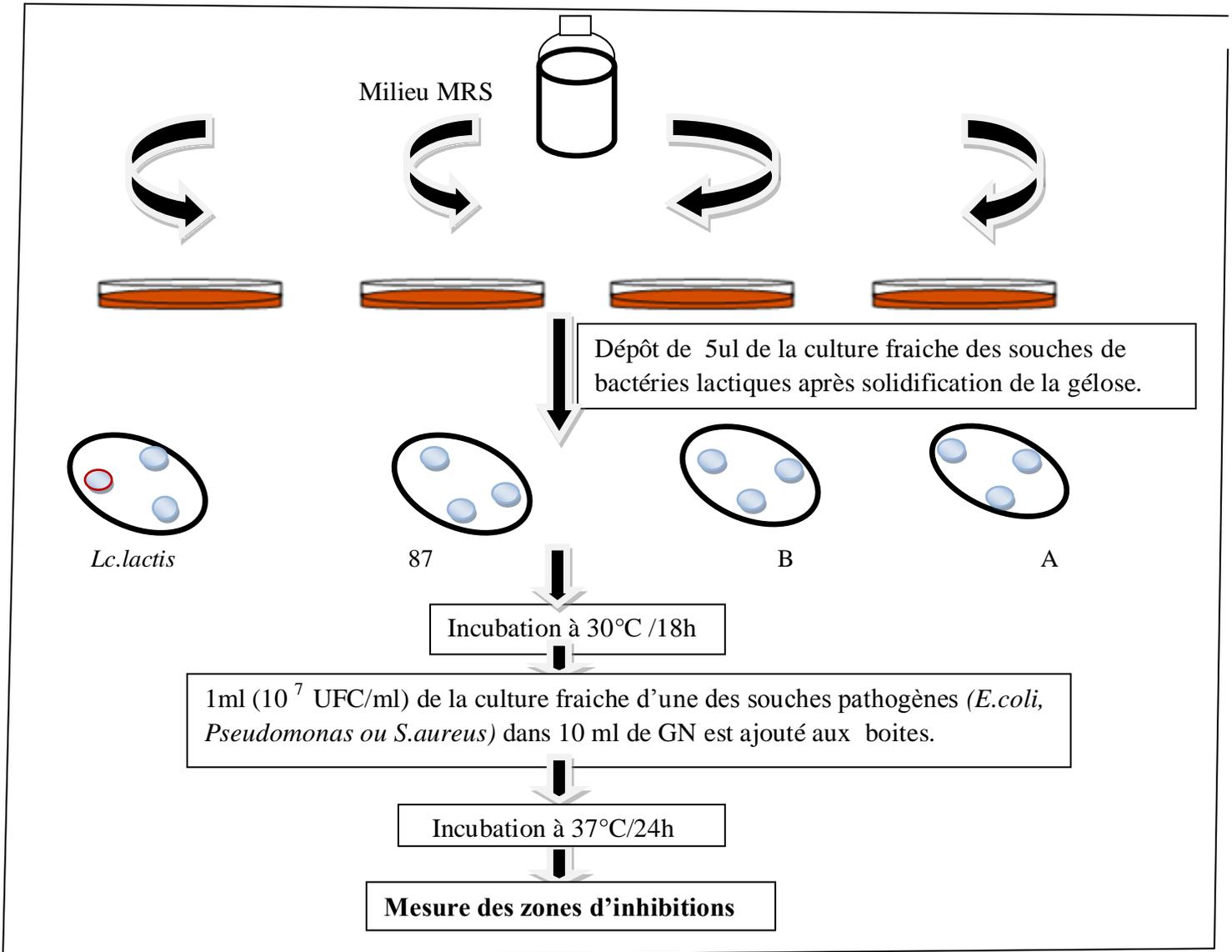


Figure 8: Test des spots

**I-10-b) Test des puits:**

Après incubation de la culture fraîche des souches de bactéries (*Lc.lactis*, 87, A et B) à 30°C/18h à raison de deux tubes par souche, les cultures fraîches de chaque souche sont centrifugées à 8000g/15min à 4°C par une centrifugeuse (Rotina 380 R). Une partie du surnageant est testé directement (natif), l'autre est placée dans des ballons pour la concentration de 5 fois par un rotavapeur, une filtration est réalisée. Des boîtes de pétri sont préalablement coulées avec le milieu Muller Hintonensemencées en masse par un taux de  $10^7$  UFC/ml de la culture fraîche d'une souche pathogène cible, après solidification des boîtes, des puits de 6mm de diamètre ont été creusés. Ces puits sont remplis par 100ul de surnageant (natif non concentré, concentré, neutralisé par NaOH N/9) et le bouillon MRS seul est utilisé

comme témoin. Pour permettre la diffusion, les boîtes sont portées au réfrigérateur à 4°C pendant 1 heure, puis incubées à 37°C/24h. Au terme d'incubation les zones d'inhibition sont mesurées (figure 9).

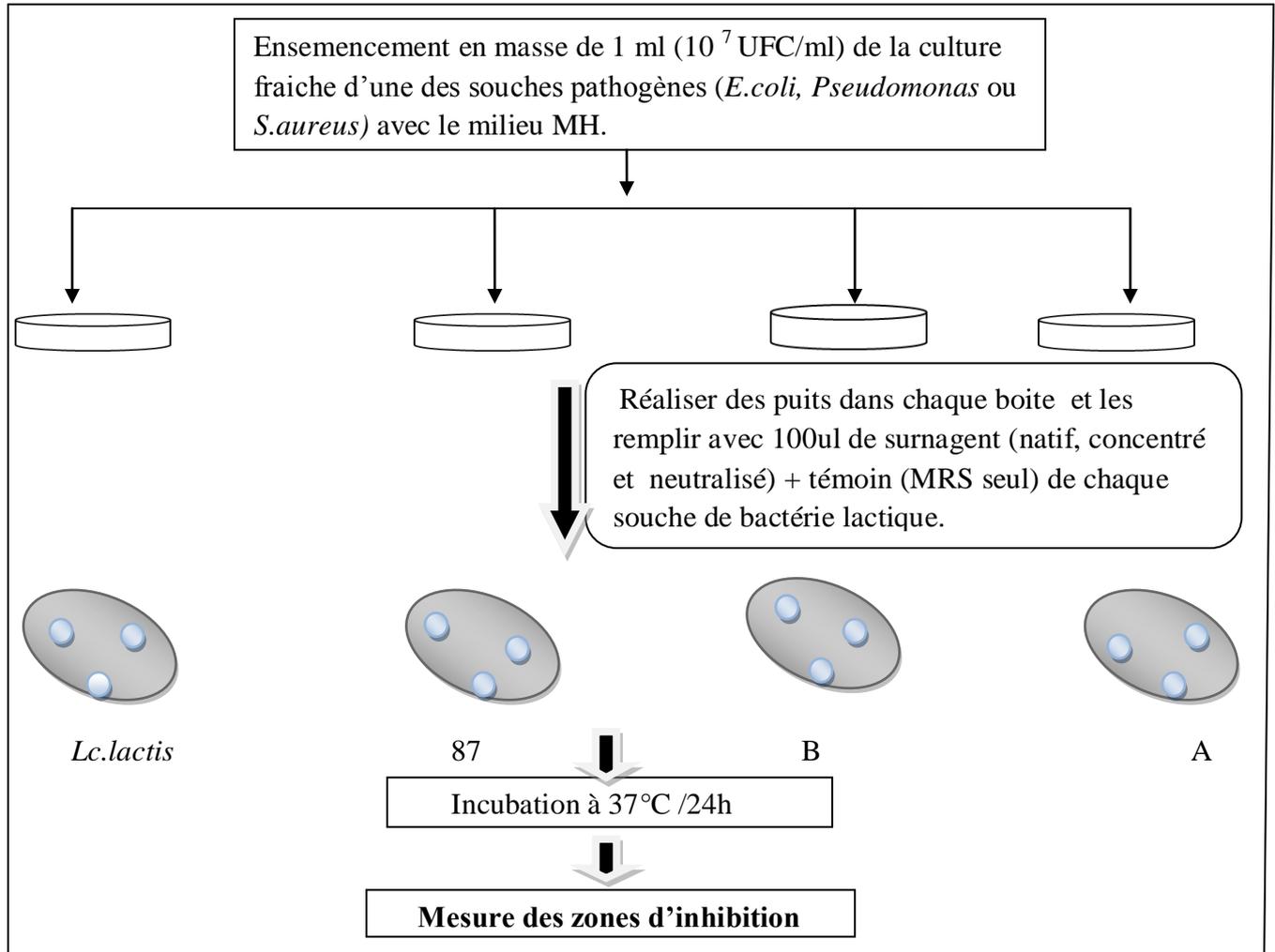


Figure 9: Test des puits

### I-11- Test de la sensibilité des souches aux quelques antibiotiques :

La détermination de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques est fondée sur la recherche des diamètres des zones d'inhibition. La méthode des disques est utilisée dans cette étude.

Des cultures fraîches de 18h des quatre souches de bactéries lactiques (*Lc.lactis*, 87, 176 et caillé) et des trois souches pathogènes (*E.coli*, *Pseudomonas* et *Stapylococcus aureus*) sont préparées. L'ensemencement respectif de  $10^8$  UFC/ml pour les souches de bactéries lactique, et  $10^7$  gr/ml pour les bactéries pathogènes sur leur gélose correspondantes (MRS et GN) a été

effectué à l'aide des écouvillons. Au terme de l'ensemencement en surface, les disques d'antibiotiques (Pénicilline, cefotaxine, oxacilline.....) de concentration variable (tableau VI) ont été déposés sur la gélose à l'aide d'une pince stérile en appuyant légèrement. Les boîtes sont incubées après diffusion (30 min à température ambiante) à 30°C pendant 48h. Les tests sont réalisés en double exemplaire. Au terme de l'incubation les zones d'inhibitions sont mesurées (Metlef et Dilmi-Bouras, 2009).

**Tableau VI: Les antibiotiques utilisés, leurs concentration et abréviations**

Nom	Abréviation	Concentration (ug /disque)
oxacilline	OX	5
Cefoxitine	FOX	30
cephotaxime	CE <sup>10</sup>	10
Cefalexine	CN	30
Chlorophenicole	C	30
acide nalidixique	NA	30
ofloxacine	OFX	5
ampicilline	AM	10
Tetracycline	TE	30

### **I-12- Test d'antagonisme :**

Pour cette étude la souche de *Leuconostoc* la plus acidifiante et présentant l'activité antibactérienne (test des spots et puits) et protéolytique sera sélectionnée pour le reste de l'étude.

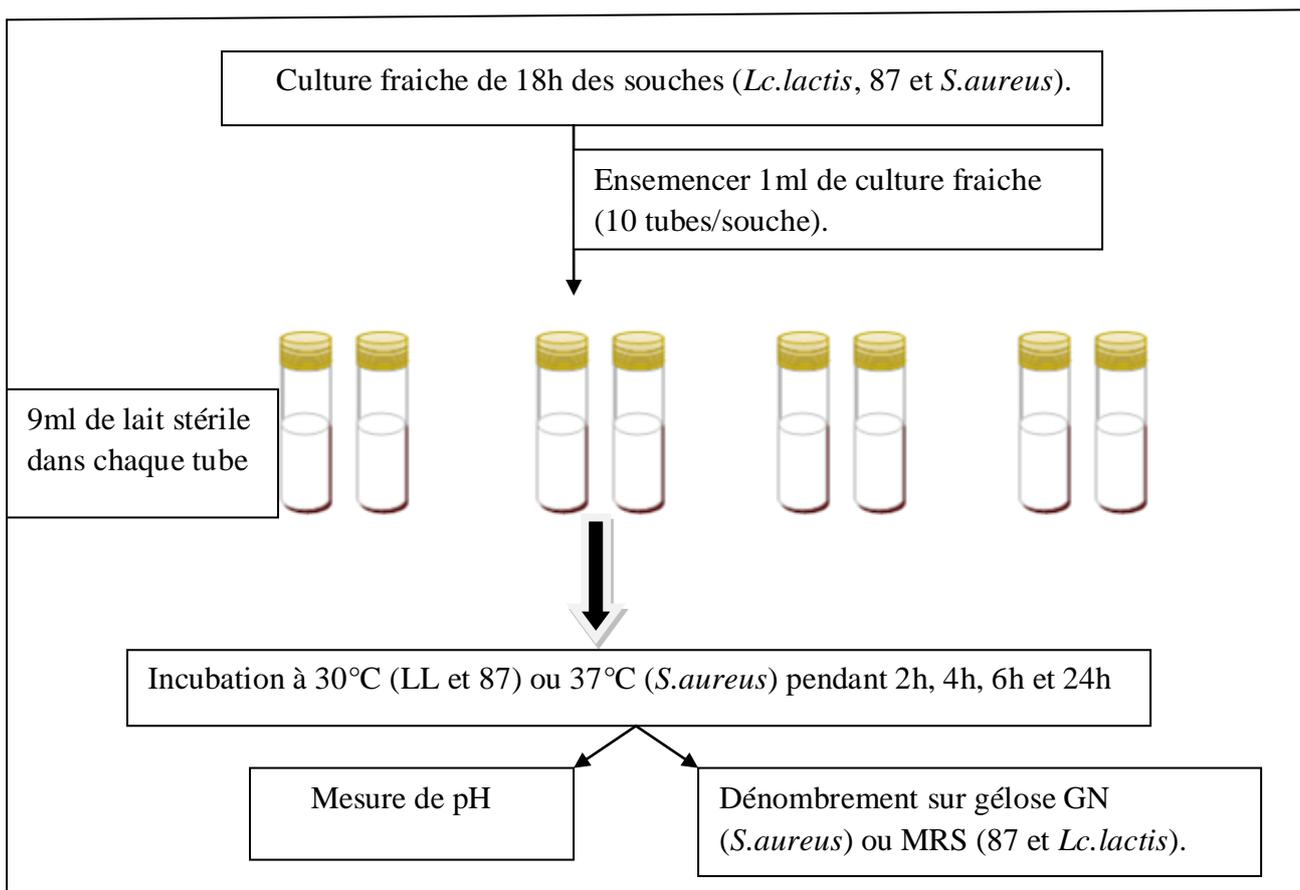
La souche de référence *Lactococcus lactis* et la souche pathogène *S.aureus* sont aussi sélectionnées pour le reste de l'étude.

### 1)-Préparation des cultures témoins:

Les cultures fraîches de 18h des trois souches (87: *L.mesenteroides ssp cremoris*, *Lactococcus lactis* et la souche cible *S.aureus*) ont été préparées.

Pour l'évaluation de la croissance des souches bactériennes tests et cible et leurs cinétiques d'acidification dans du lait de chèvre stérile trois séries de tubes de 10 ml du lait de chèvre sont préparées. Chaque tube estensemencé par 1 ml du préferment d'une des souches (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp crimoris* (87), *S.aureus*). La mesure initiale du pH et les premiers dénombrements ont été fait aux moments de l'ensemencement (0h).

Au terme de l'incubation (2h, 4h, 6h et 24h aux températures appropriées "30°C et 37°C") des dénombrements et mesure du pH ont été réalisés pour chaque souche a partir des différentes dilutions (figure 10).



**Figure 10: Etude de l'activité antagoniste vis-à-vis *S.aureus*.**

## 2) Test d'antagonismes des Co-cultures (culture mixte):

Les préferments des trois souches ont été préparées préalablement (*Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris*, *Lactococcus lactis* et la souche cible *S.aureus*).

Les différentes cultures mixtes sont préparées comme suit :

- 1) La culture mixte de *Lactococcus lactis* et *S.aureus* : préparée par un ensemencement de 1ml ( $10^9$ UFC/ml) de la culture fraîche de *Lactococcus lactis* et celui de la culture fraîche de *S.aureus* ( $10^7$ UFC/ml), dans un tube de 8ml du lait cru stérile.
- 2) La culture mixte de *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* et *S.aureus* : préparée par un ensemencement de 1ml ( $10^9$ UFC/ml) de la culture fraîche de la souche 87+ 1ml ( $10^7$ UFC/ml) de la culture fraîche de *S.aureus*.
- 3) La culture mixte 87-*Lc.lactis*- *S.aureus* : préparée par ensemencement de 1ml de chaque préferment ( $10^9$ UFC/ml pour les bactéries lactiques et  $10^7$ UFC/ml pour la souche cible) dans un tube de 7ml de lait stérile.

Ainsi une série de 10 tubes est réalisée pour chaque type de co-culture. Les mesures du pH ainsi que les dénombrements sont réalisées aux moments de l'ensemencement (à 0h) et après incubation (2h, 4h, 6h et 24h) à 30°C pour les souches *Lc.lactis* et 87 ou à 37°C pour la souche *S.aureus*. La gélose MRS est utilisée pour le dénombrement des souches de bactéries lactique et nutritive pour la souche pathogène.

## I-13- Essai de mise au point d'un fromage frais au lait de chèvre :

Le lait utilisé dans cette étude est un lait de chèvre, collecté au niveau de la région **Ouadghir (INRAA)** wilaya de Bejaia. L'alimentation des chèvres se résume à la consommation de différentes herbes du fourrage. Les échantillons du lait sont prélevés dans les conditions d'hygiène quotidiennes (pratique de l'éleveur) dans des flacons stériles de 250 ml. Puis transportés au laboratoire dans une glacière.

La fabrication du fromage repose globalement sur l'action de bactéries et de présure sur les composants du lait qui conduit à la transformation du lait liquide en masse compacte.

### 1 - L'analyse microbiologique du lait :

La qualité microbiologique du lait utilisée pour la fabrication du fromage a été réalisée.

Les flores dénombrées et recherchées sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII - Analyse microbiologique du lait cru.

Germe	Milieux utilisé et température d'incubation	Mode opératoire
Flore lactique	MRS (30°C)	Ensemencement des boîtes de Pétri en masse à partir des dilutions ( $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , ..., $10^{-6}$ ).
<i>S aureus</i> .	Chapman (37°C)	Ensemencement de 2 boîtes de Pétri en masse à partir de la dilution $10^{-1}$ .
Flore totale	PCA (30°C)	Ensemencement des boîtes de Pétri en masse à partir des dilutions $10^{-2}$ et $10^{-3}$ .
Coliformes totaux	EMB (37°C)	Ensemencement de 2 boîtes Pétri en masse à partir de la dilution $10^{-1}$ .
Coliformes fécaux	EMB (44°C)	Ensemencement de 2 boîtes de Pétri en masse à partir de la dilution $10^{-3}$ .
Enterobacteries	EMB (37°C)	Ensemencement des boîtes de Pétri en masse à partir des dilutions $10^{-3}$ et $10^{-5}$ .
Streptocoques fécaux	ROTHER (37°C)	La numération est réalisée avec la méthode de culture sur milieu liquide (méthode de NPP), une série de deux tubes de milieu Rothe est ensemencée à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-1}$ , $10^{-2}$ )

## 2 - Préparation de fromage frais :

### a)-Préparations des préferments :

Huit fioles de 50 ml de lait de chèvre stérile sontensemencées comme suit : Pour la préparation des préferments à  $10^9$  UFC/ml des souches *Lc.lactis* et 87, 40 colonies de 48h de chaque souche sontensemencées séparaiment dans 50 ml de lait. L'incubation est réalisée pendant 18h à 30°C.

Le préferment à  $10^7$ UFC/ml de *S.aureus* est obtenu en ensemencant 10 colonies de 24h dans 50ml de lait de chèvre stérile. L'incubation est réalisée pendant 18h à 37°C.

### b)- Préparation des fromages :

Deux litres de lait cru stérilisé (100°C/10min) et répartit a raison de 500ml par fiole. 4 types de fromages frais sont préparés ainsi qu'un fromage témoin au lait cru de chèvre :

- 1- **Fromage à *S.aureus* seul** : Ensemencement des 500ml de lait de chèvres stérile à un taux de  $10^7$  UFC/ml par le préferment de *S.aureus*.
- 2- **Fromage à *S.aureus* et *Leoconostoc mesenteroides ssp cremoris* (87)** : Ensemencement des 500ml de lait de chèvres stérile à un taux de  $10^7$ UFC /ml par le préferment de *S.aureus* et  $10^9$  UFC/ml de préferment de la souche 87.
- 3- **Fromage à *S.aureus*, *Leoconostoc mesenteroides ssp cremoris* (87) et *Lactococcus lactis*** : Ensemencement des 500ml de lait de chèvres stérile à un taux de  $10^7$ UFC /ml par le préferment de *S.aureus*,  $10^9$  UFC/ml par le préferment de 87 et  $10^9$  UFC/ml par le préferment de *Lactococcus lactis*.
- 4- **Fromage à *Leoconostoc mesenteroides ssp cremoris* (87) et *Lactococcus lactis*** : Ensemencement des 500ml de lait de chèvres stérile à un taux de  $10^9$  UFC/ml par le préferment de 87et celui de *Lactococcus lactis*.
- 5- **Fromage au lait cru (témoin)**: préparé sans addition de ferments lactiques et sans stérilisation.

Les laits sont étuvés à 30°C pendant 6h.

Au terme de la période de fermentation (6h), 1ml de la présure (**Caglifici**) est ajouté dans chaque fiole.

Au bout de 15min un égouttage dans des conditions d'aseptie est effectué.

Après moulage (dans des boîtes de Pétri), les fromages sont conservés à 8°C, des dénombrements ainsi qu'un suivi du pH et une mesure d'acidité Dornic sont réalisés chaque jour pendant toute la période de conservation à 8°C (15j) (figure 11).

Le taux des souchesensemencées est révélé dans les 5 types de fromages frais préparé en pesant aseptiquement 1g de fromage dans 9ml d'eau physiologique. Une agitation rigoureuse des tubes est effectuée, et des dilutions sont préparées.

Le dénombrement des souches (lactiques sur MRS ou M17, et *S.aureus* sur GN ou Chapman) est effectué chaque jour pendant 15 jours de conservation à 8°C.

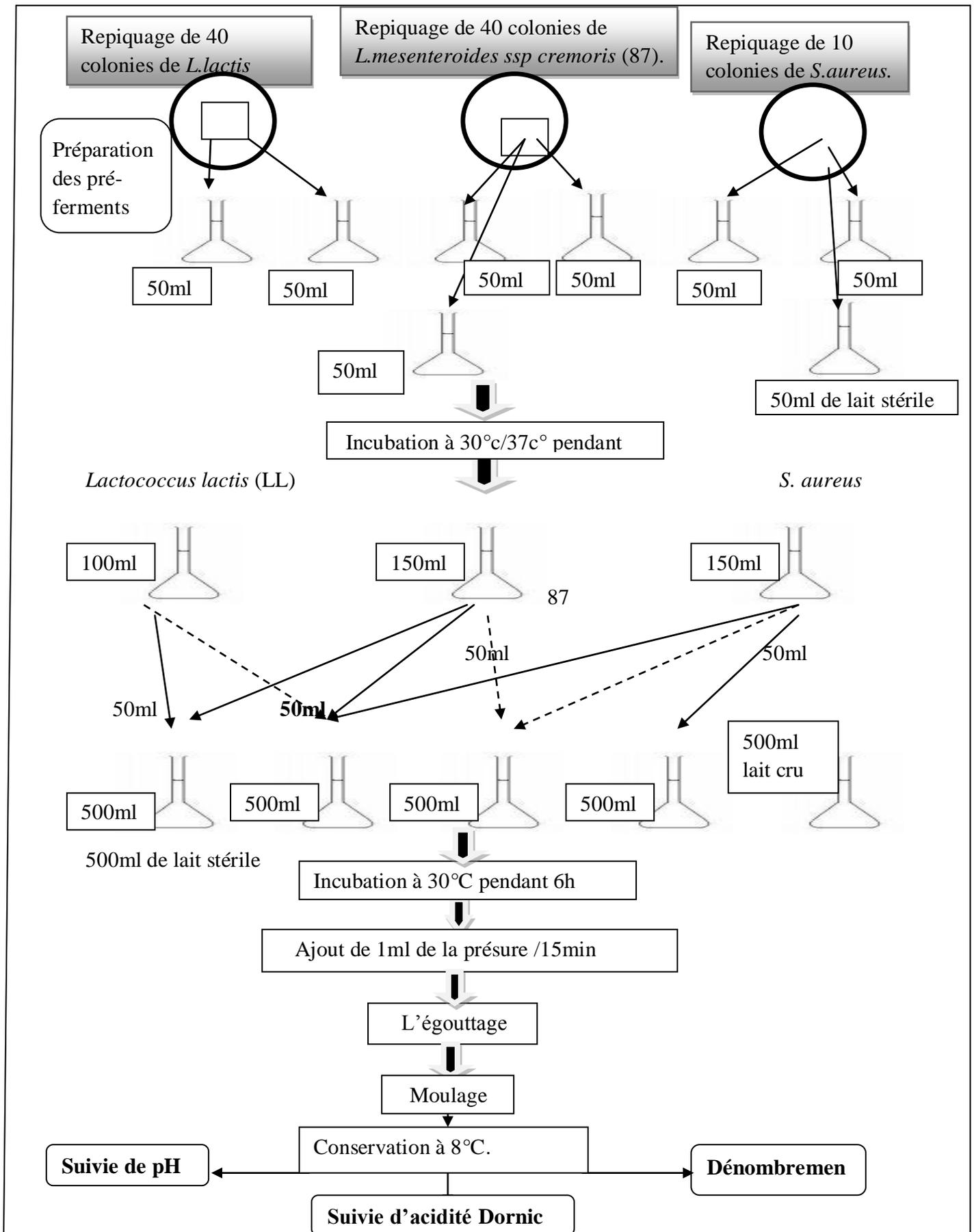


Figure 11: Etape de la mise au point d'un fromage frais a partir du lait de chèvre.

### 3-Mesure de la viscosité des fromages préparés :

Une mesure de viscosité des fromages est réalisée après 18h de conservation au niveau de Laboratoire de Génie des procédés.

On a utilisé un viscosimètre rotatif (rhéomètre) de type Couette appelé HaaKe VT500 .

Le viscosimètre est couplé à un ordinateur mené d'un logiciel HaaKe qui permet :

\*\*la programmation et l'exécution de diverses mesures.

\*\*L'acquisition et le traitement des données.



**Photo 1 : Viscosimètre**

- **Mode opératoire :**

On met sous tension les différents appareils de la manipulation; le bain-thermostaté, le viscosimètre 500, l'ordinateur. On fixe la température du bain-marie à 7°C et on laisse se stabiliser avant de commencer les mesures.

On donne au logiciel quelques indications concernant le cylindre viscosimétrique et le fluide.

### 4- Analyse sensorielle :

L'analyse sensorielle est un outil indispensable pour le contrôle de la qualité des produits alimentaires. Elle repose sur la dégustation des produits et sur l'analyse des réponses sensorielles données par les dégustateurs. Le test est réalisé pour le fromage avec les bactéries lactiques uniquement (LL/87) et pour le fromage témoin (lait cru). Le test est réalisé par 12 étudiants de fin de cycle et à base d'un questionnaire (annexe).

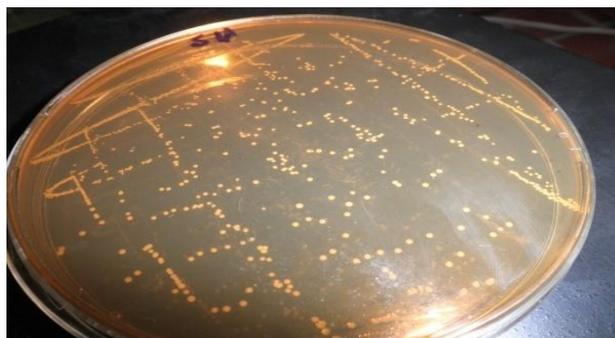
## RÉSULTÂT ET DISCUSSION

## II-1- Vérification de la pureté des souches test utilisées :

Les résultats de l'observation macroscopique (aspect des colonies, photo 2) et microscopique (coloration de Gram et aspect des colonies à l'état frais) obtenus après croissance des souches lactiques sur gélose MRS à 30°C/24h montrent qu'il s'agit du genre *Lactococcus* et *Leuconostoc*. (Tableau VIII).

**Tableau VIII: Caractères des souches lactiques utilisées :**

Aspect des colonies sur milieu MRS	Aspect des cellules	Gram	Mobilité	Catalase
Petites colonies blanchâtre, bombées	Coques (cocci, diplocoques)	Positif	Immobilés	négative



**Photo 2: Aspect des colonies des *Leuconostoc* sur le milieu MRS.**

## II-2- Standardisation des inocula bactériens :

Le but de la standardisation de l'inoculum, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes vivantes dans 1ml de culture durant toute l'expérimentation.

Afin de pouvoir étudier les propriétés technologiques et antimicrobiennes des huit souches de bactéries lactiques (7 de *Leuconostoc mesenteroides* et une de *Lc.lactis*), une standardisation des inocula (de ces dernières ainsi que celui des souches de bactéries pathogènes) est indispensable.

Après les dénombrements effectués pour les souches des bactéries, lactiques et pathogènes, le nombre de cellules viables obtenu par ml de culture (tableau XIII) pour les bactéries lactiques est en moyenne de  $10^9$  UFC/ml, et  $10^7$  UFC/ml pour les bactéries pathogènes.

Des dilutions sont effectuées pour les deux types de bactéries (lactiques et pathogènes) pour obtenir les inocula désirés.

**Tableau XIII: Standardisation des souches étudiées**

souche	LL	87	176	caillé	MR	CV <sub>46</sub>	S <sub>11</sub>
UFC/ml .10 <sup>9</sup>	1,2	2	1,5	3,2	1	2,3	1,8

### II-3-Evaluation de la qualité hygiénique du lait de chèvre :

#### 1. Mesure du pH et de l'acidité titrable :

Le pH d'un lait normal varie entre 6,6 et 6,8 ; on considère comme anormales les valeurs de pH inférieures à 6,5 et supérieures à 6,9 (Amiot *et al.*, 2002).

L'acidité Dornic est exprimée en degré Dornic, au moment de la traite, elle varie de 12 à 14°D. Cette acidité naturelle est fonction du stade de lactation, elle est liée à la teneur en caséine, sels minéraux, ions. En fin de lactation elle est de 16 à 18°D (Keilling *et al.*, 1985).

Le lait analysé est donc un lait normal car il présente un pH de 6,7 et une acidité Dornic de 14°D.

#### 2-Test de stabilité :

##### Test de stabilité à l'ébullition :

Le lait analysé est stable (aucune coagulation apparente) après un traitement thermique de 100°C pendant 5 min.

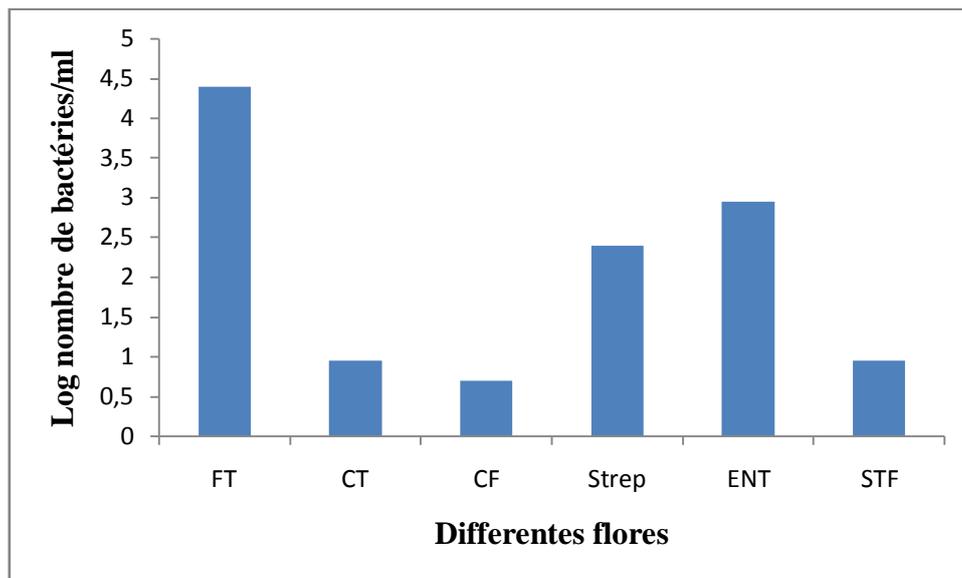
#### 3-Analyse microbiologique du lait :

L'analyse réalisée consisté en un dénombrement de la flore FTAM, les coliformes (CT et CF), *Staphylococcus aureus* (STF), les enterobacters, Clostridium sulfite-réducteurs (CSR) et les Streptocoques fécaux.

La flore microbienne du lait cru est très diversifiée. Selon son intérêt et ses conséquences en fromagerie, la flore utile ou technologique : lactocoques, leuconostocs, les flores indésirables :

coliformes, *Pseudomonas*, la flore potentiellement pathogène : *E.coli*, staphylocoques (Dirodier, 2005).

En effet les résultats obtenus {figure 12}, montrent la présence d'un taux faible en coliformes (5UFC/ml). Un grand nombre d'entre elles étant des hôtes habituels de l'intestin des mammifères, leur présence dans le lait, est l'indice d'une contamination fécale (Dieng, 2001). Du fait de leur facilité d'adaptation et de leur vitesse de croissance, quelques bactéries peuvent créer en quelques jours une population dominante (Mége et al., 2004).



**Figure 12: résultats de l'analyse microbiologique du lait de chèvre**

On a constaté la présence de 9gr/ml de Staphylocoques. Il est présent naturellement au niveau de la peau de la mamelle et des trayons, donc la présence de staphylocoques dans le lait paraît quasi inévitable (Fatet, 2004). Leur fréquence tend à augmenter du fait de leur antibiorésistance (Nkosadibiatcho, 2006). La concentration de *Staphylococcus aureus* est <5'000 UFC par ml (Schaeren, 2007).

La présence des entérobactéries dans les échantillons de lait analysés est élevée (9. 10<sup>2</sup> gr/ml). Il est considéré généralement comme un indicateur de mammite ou de mauvaises conditions d'hygiène au cours de la lactation. Leur présence révèle une contamination probable à partir des animaux, du trayeur ou de matériel (Tabet, 2009). La présence de Streptocoques fécaux (2,5 10<sup>2</sup>UFC/ml) est expliquée par un manque d'hygiène chez les éleveurs (Hajj Semaan et al., 2011).

Les résultats obtenus (figure 12) montrent un taux de  $25 \cdot 10^3$  UFC/ml de la flore totale, selon **Grenon** et ces collaborateurs (2004), la flore totale dans un lait normal ne doit pas dépasser  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml.

En se référant aux normes Algériennes tirées de l'arrêté interministériel issu du J.O.R.A (Journal Officiel de la République Algérienne) n°35 du 27 Mai 1998 (Aoul Safar 1419). (Tableau X). La présence de *S.aureus* et des streptocoques dans les échantillons de lait analysés témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique.

**Tableau X: Résultats obtenu en comparaison avec les critères microbiologiques des laits et produits laitiers.**

Germes	M (UFC/ml)	Résultats obtenus (UFC/ml)
FTAM (flore total aérobie mésophile)	$10^5$	$25 \cdot 10^3$
Coliformes fécaux	$10^3$	5
Streptocoques fécaux	Abs/0,1ml	$2,5 \cdot 10^2$
Clostridium sulfite-réducteurs	50	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	9

M : Norme désignant la valeur maximal à respecter

Abs : Absence

#### II-4-Etude du pouvoir acidifiant des souches :

Le suivi du pH et de l'acidité montre une diminution progressive du pH pour toutes les souches isolées et une augmentation de l'acidité. En effet, les résultats obtenus montrent que 4 souches {*L.mesenteroides ssp cremoris*, *Lactococcus lactis* (caillé) et *L.mesenteroides* (176)} ont un pouvoir acidifiant important avec un pH final qui varie entre 3,94 et 4,19 et une acidité Dornic entre 65,93 et 41,95 °D (Tableau XI).

**Tableau XI : pH et acidité de quatre souches de bactéries lactiques cultivées dans du lait cru de chèvre.**

Souches	pH initial	pH final	Acidité initiale	Acidité finale
<i>L.m.cremoris</i>	6,59	3,94	13,98	63,93
<i>Lc-Lactis</i>	6,57	4,19	13,98	41,95
B	6,58	3,97	11,98	53,94
A	6,62	3,98	13,98	65,93
C	6,68	6,57	17,98	22
D	6,64	5,85	13,98	50,94
E	6,85	6,13	15,98	41,95
F	6,74	6,41	15,98	23,97

Au terme de cette étude les souches (87, A) qui présentaient le meilleur pouvoir acidifiant ainsi que la souche de *L.lactis* sont retenus pour la suite de ce travail.

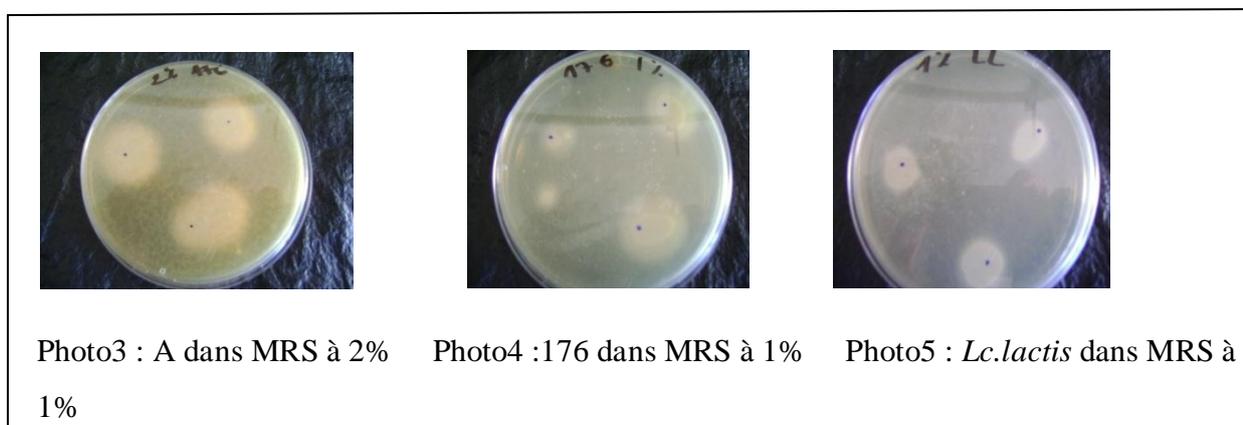
## II-5- Test protéolytique :

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées ne montrent aucune zone d'activité protéolytique dans le MRS à 10% de lait écrémé. L'activité protéolytique est uniquement présente dans les milieux MRS à 1% et à 2% (tableau XII).

En effet les zones les plus importantes (30mm dans le milieu MRS à 1% et 23mm dans le milieu MRS à 2%) sont obtenues pour la souche *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (87).

**Tableau XII: Test d'activité protéolytique**

Souche	Diamètre (mm)		
	MRS1%	MRS2%	Lait écrémé à 10%
<i>Lc.lactis</i>	19,33	16	00
<b>B</b>	20	18	00
<b>87</b>	30	23	00
<b>A</b>	25	21,6	00

**Figure 13: Exemples de résultat de test protéolytique.**

En effet cette clarification (zones d'hydrolyse claires) est certainement due à la présence d'enzymes protéolytiques.

## II-6-Activité antibactérienne :

Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Certaines d'entre elles synthétisent dans des conditions favorables des bactériocines pouvant avoir une action antibactérienne vis-à-vis des germes pathogènes. Elles sont de structure peptidique, comme la nisine. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats.

Dans ce test d'activité antibactérienne, les souches de bactéries lactiques ont montrées un pouvoir inhibiteur à l'égard des trois souches de bactéries pathogènes testées (*S.aureus*, *pseudomonas* et *E.coli*).

### Vérification de la pureté d'*E.coli* :

Les résultats des tests morphologiques et biochimiques ont montré qu'il s'agit d'une souche d'*E.coli* puisque elle fermente le lactose à 44°C et elle produit du gaz, elle est Gram – et présente sur le milieu EMB un éclat vert métallique.

#### a) Test des spots :

Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau XIII : Résultats de test des spots.**

souche	Diamètre sans spot (mm)		
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
<b>A</b>	42 ,5	37,5	36,25
<b>87</b>	41,25	40	35
<b>B</b>	37,5	45	45
<i>Lc.lactis</i>	30	27,5	22,5



Photo 6: *B/E.coli*



Photo 7: *Lc.lactis/E.coli*

**Figure 14: Exemple de résultat de test des spots.**

Ces résultats indiquent que les bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre sont capable de synthétiser des substances antibactériennes à l'égard des bactéries pathogènes (*S.aureus*, *E.coli* et *Pseudomonas*).

Effectivement des zones d'inhibition allant de 30mm à 42,5mm sont obtenues vis-à-vis *S.aureus*, de 27,5 à 40 mm vis-à-vis *E.coli* et de 22,5 à 36,5 vis-à-vis *Pseudomonas*.

Les résultats obtenus (tableau XIII) montrent que les souches de *Leuconostoc* ont un meilleur pouvoir antibactérien par rapport à la souche de référence *Lactococcus lactis*.

## a) Test des puits :

Pour réaliser ce test on a utilisé les surnagent natifs, concentrés et neutralisés et le bouillon MRS comme témoin.

Le pH des surnagents est mesuré avant et après concentration par rotavapeur.

Les résultats du test sont rapportés dans le tableau XIV

**Tableau XIV: Diamètre des zones d'inhibition avec le test des puits.**

Souche	Diamètre (mm)			
	surnagent	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>S.aureus</i>
<b>87</b>	Na (pH =4,5)	27,5	0	23,5
	C (pH=4,01)	40	19	31,5
	Ne	18	0	17,5
<b>A</b>	Na (pH =4,5)	30	6	20
	C (pH=4,02)	38,5	16	22,5
	Ne	21	0	15
<b>B</b>	Na (pH =4,5)	0	30	20
	C (pH=4)	20	30	25,5
	Ne	0	0	17,5
<b><i>Lc.lactis</i></b>	Na (pH =4,5)	0	0	0
	C (pH=4,45)	27,5	43	35
	Ne	0	0	0
	T	0	0	0

**Na** : surnagent natif

**C** : surnagent concentré

**Ne** : surnagent neutralisé avec NaOH (N/9) stérile.

**T** : bouillon MRS comme témoin



Photo 8: 87/*E.coli*

photo 9: *Pseudomonas* /B

photo 10 : A/*E.coli*

**Figure 15: Exemples de résultats du test des puits.**

Ces résultats montrent que les souches de *Leuconostoc* montrent un meilleur pouvoir inhibiteur vis-à-vis les trois souches pathogènes testées par rapport à *Lactococcus lactis*.

### II-7- Effet des antibiotiques sur la croissance des souches :

On a testé l'effet de 9 antibiotiques sur la croissance des quatre souches les plus acidifiantes et sur les trois souches pathogènes (Tableau XV).

**Tableau XV:** Résultats d'antibiogramme.

Souches	Diamètre (mm)						
	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lc.Lact is</i>	<i>L.m ssp c</i> (87)	<i>L. m</i> (176)	<i>L. m</i> (caillé)
Ofloxacin (OFX)	28 (S)	20 (S)	20 (R)	8 (S)	10 (S)	10 (S)	9 (S)
Cefalexine (CN)	24 (S)	0 (R)	0 (R)	12 (S)	10 (S)	10 (S)	8(S)
Oxacilline (OX)	0 (R)	0 (R)	15 (S)	17 (S)	13 (S)	14 (S)	20 (S)
Cefoxitine (FOX)	20 (R)	0 (R)	0 (R)	15 (R)	8 (R)	10 (R)	10 (R)
Cephotaxime (CE)	30 (S)	15 (S)	20 (R)	15 (R)	14 (R)	12 (R)	15 (R)
Chlorophenicole (C)	30 (S)	10 (S)	30 (S)	30 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)
Acide nalidixique (NA)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Ampicilline (AM)	15 (S)	10 (S)	10 (S)	15 (R)	10 (R)	10 (R)	8 (R)
Tétracycline (TE)	/	/	/	40 (S)	25 (S)	25 (S)	22 (S)

R : résistance

S : sensibilité

ABT: antibiotiques

Ces résultats sont donnés en se référant à **Soussy (2010)** et aux résultats obtenus à BIO RAD (2011) ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)). En effet, les bactéries *L.mesenteroides* résistent aux cefoxitin cephotaxime, acide nalidixique et ampicillin. Et elles sont sensibles aux autres antibiotiques utilisés. *S.aureus* est sensible seulement à trois antibiotiques (oxacillinchlorophenicol, ampicilline), *E.coli* à (ofloxacin, cefalexine cephotaxime, chlorophenicol et ampicilline), et *pseudomonas* résiste aux (cefalexine, oxacilline, cefoxitine et acide nalidixique).

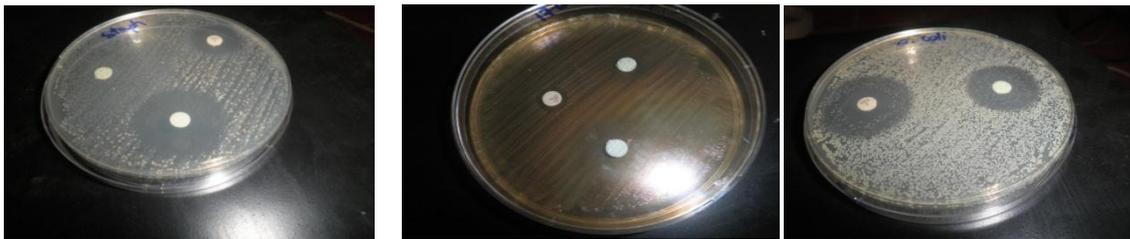


Photo 11: *S.aureus*

Photo 12: *L.mesenteroides* (A)

Photo 13: *E.coli*

**Figure 16: Résultats de l'antibiogramme.**

## **II-8- Etude de l'activité inhibitrice des souches de bactéries lactiques:**

Pour réaliser cette étude une souche pathogène (*S.aureus*) est retenue, un suivi de l'évolution de la croissance de cette dernière en présence de *L.mesenteroide ssp cremoris* et *Lc.lactis*. Mais auparavant une étude de la croissance des souches étudiées dans ce test a été réalisée (figure 17), montre que le taux de ces dernières augmente. Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes, vu leur activité d'antagoniste qui est due à la production de métabolites antimicrobiens tels que les bactériocines (**Achemchem et al., 2004**).

La figure (18) nous montre que les espèces lactiques ont provoqué une inhibition importante de la croissance de *S. aureus*. Ces résultats indiquent l'existence d'agents d'inhibition produits par les bactéries lactiques (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

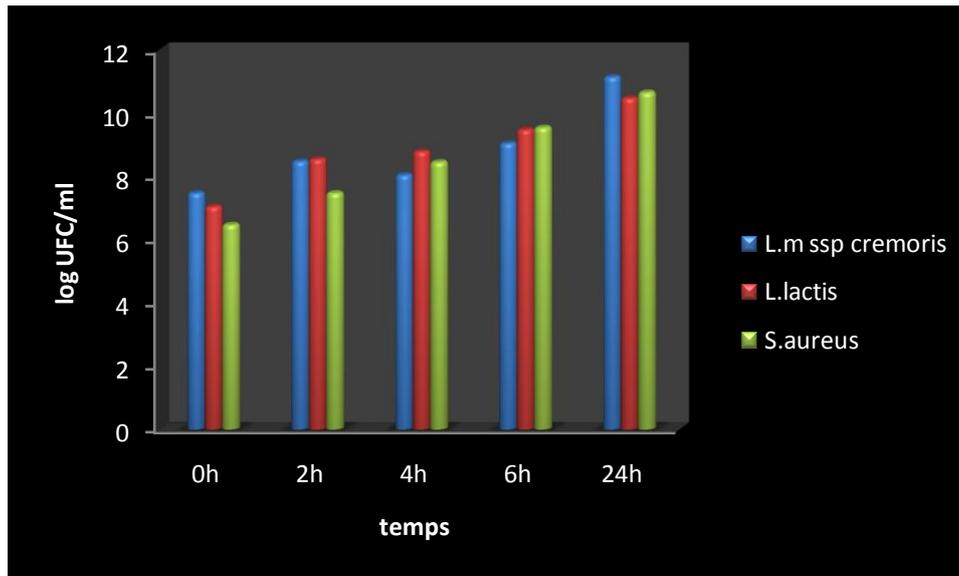


Figure 17 : Evolution de la croissance *L.mssp cremoris*, *L.lactis* et *S.aureus* dans le lait de chèvre.

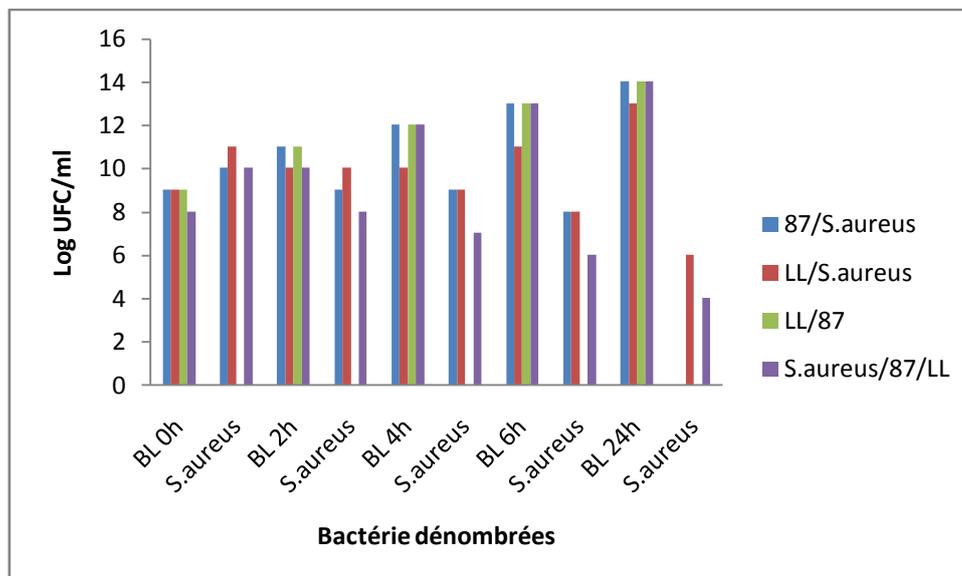


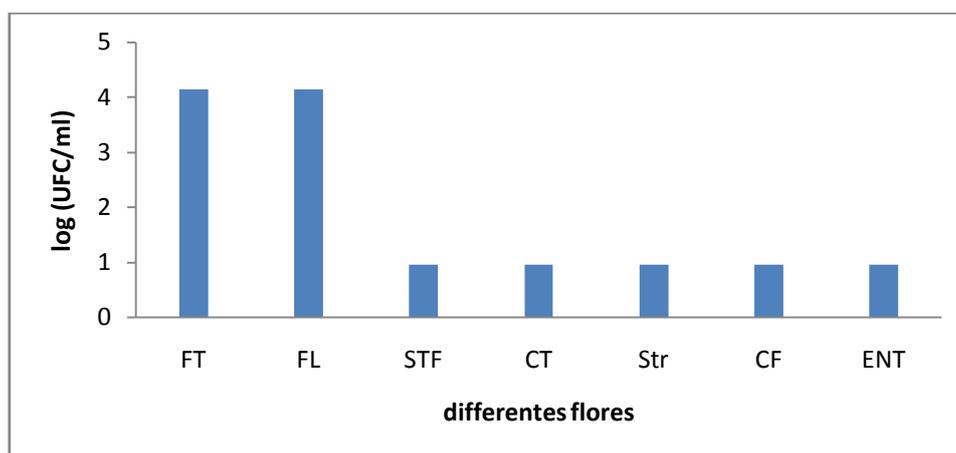
Figure (18) : Effet antagoniste des bactéries lactiques sur la croissance de *S.aureus*

L'interprétation de la figure nous confirme l'effet antagoniste de souches *L.mesenteroides ssp cremoris* et *Lc.lactis* sur la croissance de *S.aureus*, en effet, on remarque pour la culture mixte *L.mesenteroides ssp cremoris/S.aureus* que *S.aureus* est stable pendant les 4 premières heures d'incubation, mais son taux commence à diminuer après 6h pour disparaître complètement après 24h. *S. aureus*, dans la culture mixte *Lc.lactis/S.aureus* diminue de façon continue et arrive au bout de 24h à un taux de  $1,4 \cdot 10^4$  UFC/ml. En fin, pour la culture mixte des trois souches {*S.aureus/L.mesenteroides/Lc.lactis*}, le taux de germe pathogène diminuera jusqu'à un taux de  $7,94 \cdot 10^3$  UFC/ml après 24h.

## II-9-Mise au point d'un fromage frais :

### 1-Analyse microbiologique du lait utilisé :

L'analyse réalisée consiste en un dénombrement de la flore FTAM, les coliformes (CT et CF), *Staphylococcus aureus*(STF), les enterobacteries (ENT), Streptocoques (Str) et la flore lactique (FL), (figure 19).



**Figure 19: Différentes flores dénombrées dans le lait.**

Les résultats obtenus indiquent la présence de la majorité des flores de contamination (FT, FL, STF, CT, CF, Str et ENT) témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique (tableau XVI).

**Tableau XVI: Résultats de l'analyse du lait**

Souche	M (UFC/ml)	Résultats obtenus (gr/ml)
FTAM (flore total aérobie mésophile)	$10^5$	$14. 10^3$
Coliformes fécaux	$10^3$	9
Streptocoques fécaux	Abs/0,1 ml	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	9

M : le nombre maximum des germes.

D'après le J.O.R.A (1998), ce lait est contaminé, la présence des Streptocoques fécaux et *S.aureus* le rend impropre à la consommation voir dangereux pour le consommateur.

## 2. Mesure de la viscosité :

Pour le calcul de la viscosité de chaque échantillon on applique la formule suivante :

$$\mu_{\text{app}} = \zeta / \dot{\gamma} \text{ or } \zeta = A \dot{\gamma}^n \text{ donc } \mu_{\text{app}} = A \dot{\gamma}^{n-1} \text{ en poiseuille}$$

$\mu_{\text{app}}$  : viscosité apparente

$\dot{\gamma}$  : taux de cisaillement ( $\text{s}^{-1}$ )

A : indice de consistance

n : indice d'écoulement

Les fromages présentaient un écoulement plastique. Les niveaux de stress initial et final sont des fonctions hyperboliques du taux de cisaillement (Korolczuk, 1993).

Avec le fromage on ne peut pas parler d'une valeur mais d'une gamme de viscosité, car il n'est pas homogène, donc sa viscosité change en fonction de la vitesse de déformation. Le tableau (XVII), nous donne les mesures effectuées.

**Tableau XVII: viscosités des fromages.**

Fromage	Période ( $\text{s}^{-1}$ )	Viscosité (poiseuille)
Lait cru	140-560	Varie de 0,167 à 0,085
<i>L.m. sspcremoris/S.aureus</i>	100-400	Varie de 1,52 à 0,637
<i>S.aureus</i>	100-400	Varie de 0,697 à 0,31
<i>Lc.lactis/L.mssp mesenteroides/L.m. sspcremoris</i>	100-350	Varie de $3 \cdot 10^{181}$ à $10^{230}$

Le logiciel de mesure indique que l'indice d'écoulement <sup>(1)</sup> est compris entre 0 et 1, pour les trois premiers fromages, alors ceux sont des fluides rhéofluidifiants ou pseudo-plastiques (non newtoniens), pour le fromage préparé avec *Lc.lactis/L.m ssp mesenteroides/L.m. ssp cremoris* a une indice de 90,56 ce qui nous donne une viscosité importante. C'est un fluide dilatant.

## 3. Suivi de l'évolution du pH et l'acidité Dornic dans le fromage :

Dans cette étude 4 types de fromages (fromage *Lc.lactis/L.mesenteroides*, *L.mesenteroides* seule, *Lc.lactis/L.mesenteroides /S.aureus*, *S.aureus* seul) et un fromage au lait cru de chèvre sans aucune inoculation des ferments (témoin) (photos14)



**Photo 14: Fromages préparés**

Pendant les 15 jours de suivi on a constaté une diminution du pH pour les 5 échantillons de fromage, il atteint 4,19 pour le fromage (*L.m.cremois/Lc.lactis*), avec une diminution en moyenne de 0,2 unité pour tous les types de fromages. Comme le montre la figure20.

Selon **Hamama et al(1995)**, l'acidité Dornic et le pH d'un fromage frais peuvent atteindre, respectivement 90°D et 4,5.

En effet notre fromage a gardé ses propriétés tout au long de sa conservation.

L'acidité Dornic du fromage préparé augmente au cours du temps, de 2 à 4 D° pour les fromages (*L.m.cremois/L.lactis*, lait cru, *L.m.cremois/S.aureus*, *L.m.cremois/Lc.lactis/S.aureus*). Et le fromage de *S.aureus*, on a remarqué une faible acidité jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour où elle a commencée à augmenter de 2 D°, mais pendant le 15<sup>ème</sup> jour elle s'est doublée deux fois.

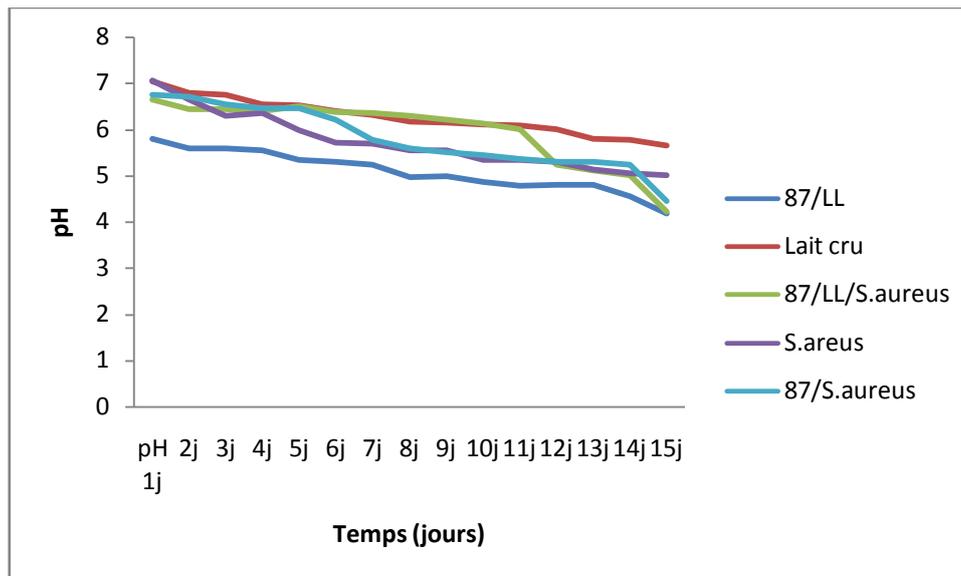


Figure 20: Evolution de pH

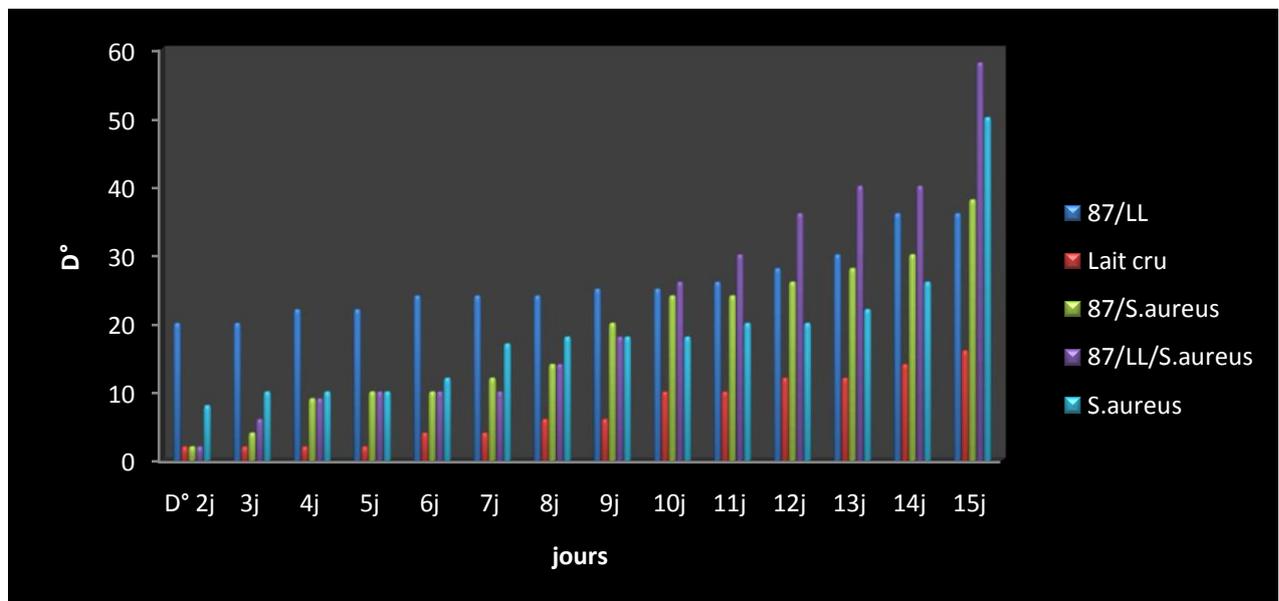
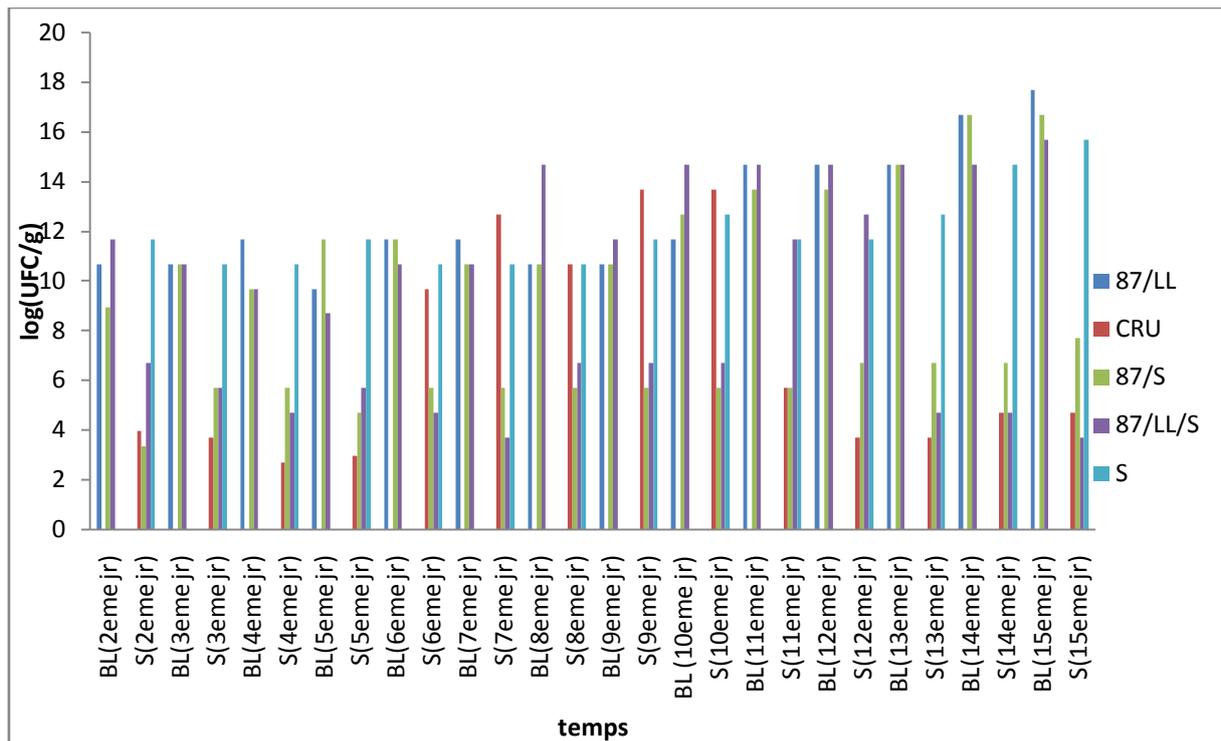


Figure 21: Evolution de l'acidité Dornic

#### 4- Suivis de l'évolution de la croissance de la souche de référence (*Lc.lactis*) et *L.mesenteroides* ssp *crimoris* (souche 87) et *S.aureus* dans les fromages préparés :

Le dénombrement des souches des (*Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp *crimoris* et *S.aureus*). Cette étude a été faite pendant 15 jours de conservation à 8°C, et les résultats trouvés sont illustrés dans la figure suivante.



**87/LL**: fromage de 87/*Lc.lactis*

**87/S**: fromage de 87/*S.aureus*

**S**: fromage de *S.aureus*

**Cru** : fromage de lait cru

**87/LL/S**: fromage de 87/*Lc.lactis*/*S.aureus*

**Figure 22: Suivis de l'évolution de la croissance des différentes souches étudiées dans les fromages préparés.**

D'après ces résultats, le nombre des bactéries lactiques augmente tout au long de la conservation du fromage et cela pour tous les types de fromage ( $0,9 \cdot 10^{18}$  UFC/ml pour le fromage 87/*Lc.lactis*,  $0,5 \cdot 10^{16}$  UFC/ml pour le fromage 87/*S.aureus* et  $0,9 \cdot 10^{16}$  UFC/ml pour le fromage 87/LL/*S.aureus*).

Le taux de *S.aureus* est élevé (dans les 14<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours) dans le fromage de lait cru ( $0,5 \cdot 10^{17}$  UFC/ml), et une augmentation remarquable dans le fromage de *S.aureus* à partir de 14<sup>ème</sup> jour ( $0,5 \cdot 10^{15}$  UFC/ml).

Le nombre de *S.aureus* dans le fromage de 87/*S.aureus* a atteint son taux maximal ( $0,5 \cdot 10^{16}$  UFC/ml).

Le nombre de *S.aureus* dans le fromage 87/*Lc.lactis*/*S.aureus* varie le long de la conservation, avec un taux de  $0,5 \cdot 10^{16}$  UFC/ml pour le premier jour, une baisse de 3 logs de

ce dernier est remarquée au bout de 7<sup>ème</sup> jour ( $0,5 \cdot 10^4$  UFC/ml). Néanmoins, une augmentation est observé ( $0,5 \cdot 10^{16}$  UFC/ml) dans le 15<sup>ème</sup> jour.

### **5- Analyse sensorielle des fromages préparés :**

Les résultats de l'analyse sensorielle ont montré que 50 % des jurys de dégustation trouve que le fromage préparé avec les souches *Lc.lactis* et *L.mesenteroides ssp cremoris* présente une meilleur texture avec un gout et odeur agréable et facilement tartinable.

30 % de ce jury n'ont trouvés aucune différence spécifique entre les deux fromages.

20 % restants trouvent que les fromages ont une odeur typique au lait de chèvre et un goût fort.

## CONCLUSION

## Conclusion :

L'étude des propriétés technologiques et antibactériennes de sept souches de *L.mesenteroides* et une souche de co-culture *Lc.lactis*, a montré que trois souches (*L.mesenteroides cremoris* et 2 souches de *L.mesenteroides mesenteroides*) en plus de *Lc.lactis* ont un pouvoir acidifiant élevé, pH finale de 4,19 à 3,94 et acidité Dornic de 41,95 à 63,93, et sont dotés d'une activité antibactérienne vis à vis non seulement de *S. aureus* mais aussi de *Pseudomonas* et *E.coli* et d'une activité protéolytique qui varie selon les souches .

L'analyse du lait a montré la présence de la flore de contamination, mais sans dépasser les normes autorisés. Néanmoins, le lait utilisé est de bonne qualité nutritionnelle : riche en protéines (43,6g/l), matière grasse (57,2) g/l et lactose (52,3) g/l.

Les souches précédemment sélectionnées et le lait analysé sont utilisés pour la mise au point de fromages frais de chèvre (5types). Le suivi des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques pendant une conservation de quinze jours à 8°C a montré un pH de 4,19 et une acidité Dornic de 58 D° au terme de la conservation. Un développement graduel de *L.mesenteroides cremoris* et *Lactococcus lactis* et une diminution de *S.aureus* de 3 logs est notée pour les fromages inoculé par les bactéries lactiques. Le meilleur effet antagoniste est obtenu dans le fromage inoculé par les deux souches lactiques, un taux de  $10^4$  UFC/ml est obtenu par rapport à  $2,5 \cdot 10^{11}$  UFC/ml dans le fromage témoin (*S,aureus* seul) ,

L'analyse sensorielle a montré que les fromages testés (fromage avec seulement *L.mesenteroides cremoris* ou avec *L.mesenteroides cremoris*) avez une texture que le fromage témoin (lait cru) avec goût meilleur et odeur agréable, (50% des dégusteurs).

En fin, Il faut noter que le stage pratique que nous avons effectué au niveau de laboratoire LMA à l'université, nous a permis d'enrichir nos connaissances sur le plan expérimentale. Il nous a également permis d'exploiter les connaissances théoriques acquises durant notre formation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

### A

Adiv et Ofival. (2004). Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaires dans le jambon cuit supérieur. 37p

Avalos. D-A. (2007). Faisabilité de la production en Mexique de fromage de chèvre additionnés de piment : aspect technologiques, sensoriels, sanitaire et économique. Thèse de doctorat, Nancy-université INPL, Lorraine, Laboratoire de Science et Génie Alimentaire. 241p

Amiot J, Angers P, Baznet L, Britten M, Boutonnier J-L, Castaigne F, Champagne C, Dupuis C, Fliss I, Fournier S, Gardner N, Jean J, Lamontagne M, Lamoureux M, Lebeuf Y, Michel J-C, Moineau S, Paquin P, Pouliot M, Pouliot Y, Reitz-Ausseau J, Jacques R, Gelais D, Simpson R, Tardif R, Tirard-Collet P et Verge J. (2002). Science et technologie du lait, Transformation du lait. p54

Achemchem F, Abrini J, Martinez-Beuno M, Valdivia E et Maqueda M. 2004 Mai. Purification et caractérisation d'une bactériocine anti *Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. 384 -388

### B

Boubezari M- T. (2010). Contribution a l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de jijel. Magistère, université MENTOURI de CONSTANTINE, faculté des sciences département des sciences vétérinaires. 124p.

Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires. 149p

Baharak A. (1999). Effet de la température sur la croissance bactérienne et la production de composés d'arôme dans du lait supplémenté de citrate par des bactéries lactiques mésophiles aromatisants en culture mixte. P11

Bianchi-Salvadori B et l'équipe d'action mixte ISO-FIL. (2006). Norme internationale. Première édition. P2.

Bakar Diop M, Destain J, Tine M et Thonart. (2010). Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. 341-350

Barth K, Horvat E, Kern. A, Maurer V, Muntwyler J, Simantke C, Stöger E et Reinmuth B. (2010). Chèvres laitières bio. p2

Bull. Soc. (2009). Pharm. Bordeaux, 148,7-16

*C*

Chene C. (2002). Les acides organiques. p1

Camille Delaras (2007) : Microbiologie pratique pour le laboratoire. p 227-236

*D*

De Roissart H et Luquet F. (1994). Bactéries lactiques. Volume 1. P : 25-26- 30.

Dirodier A, (2005). Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages. p1

Drider D et Prévost H. (2009). Bactéries Lactiques. Physiologie, métabolisme, génomique et Application Industrielles. Edition 2010. Page:1

Dilmi Bouras A. (1991). Assimilation du cholestérol par les bactéries lactique. 1991. Thèse de doctorat. Institut national agronomique, EL HARRACH-ALGRE. Sciences alimentaire. 143p

Dieng M. (2001). Contribution a l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur la marche DAKAROIS. Thèse de doctorat, université CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR. 113p

Desmazeaud M. (1998). Laboratoire de recherches laitières INRA Jouy-en-Josas. Bactéries lactiques et qualité des fromages. P1

Dortu C et Thonart P. (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 143-145.

Drouault S et Corthier G. (2000). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. France. pp. 101-117.

Devoyod J-J et Poullain F. (1988). Les Leuconostoc Propriétés: leur rôle en technologie laitière. France, pp. 249-280.

Dortu C et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, vol. 13, p. 143-154.

### *E'*

Eck A, Hermier J, Lablee J, Lenoir J et Weber F. (1987). Le fromage. P224

Elmoualdi L, Labioui H, BOUSHAMA L, Benzakour A, Ouhssine M et Elyachioui M. (2008). Activité bactéricide d'une souche de *lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 8, 7-18.

### *F'*

Fatet P. (2004). Les staphylocoques dans les produits laitiers. P34

## G

Giraud. E. (1993). Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche *delactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de doctorat, université de Provence AIX-MARSEILLE 1

Givry S. (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifermentans*.p18

Grenon. C, Fournier. S et Goulet. J. Lait de qualité. Saint Hyacinthe. 2004 Oct. 10, 2-39.

Guillaume, Belbis H. (2007). Flore du ruman : origine, composition, conséquences physicopathologiques

Guiraud JP et Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition: Usine nouvelle .Paris. 239p.

Guiraud JP. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod. Paris. 651p.

## H

Hajj Semaan E, Dib H, Abi Ramia R et Chedid M. Caractérisation chimique et qualité bactériologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais. August 2010 Out, Dekwaneh, 2011 Janvier: Lebanon. P. 21-29.

Horley J-P, Donald A, Klein, Lansing, M Prescott L, M. Sherwood, J M Welley, Christopher et J Voolverton., (2008). Microbiologie. Edition 2010. p579.

HO Thi Nguyet Thu. (2008). Étude de la flore lactique du NEM CHUA, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de doctorat, université BORDEAUX 1, spécialité : sciences des aliments et nutrition. 201p.

## *K*

Kanoun K. (2006). Activités acidifiante et protéolytique de bactéries lactiques isolées du yaourt. matériels et méthodes, 21-59

Keilling J, de Wilde R, François M. Luquet, Bonjean-Linczowski Y. (1985). Laits et produits laitiers : vache. Brebis. Chèvre. P350

## *L*

Labioui H, Elmoualdi L, El yachioui M et Ouhsine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 238, 237-250.

Le jaouen J-C. (2004). Les fromages de chèvre disparus ou en voie de disparition. p.1-4

Leveau J-Y et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. P179

Luquet F-M et Corrieu G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Edition 2005. p113.

Luquet F-M, Lejaouen J-C, Mouillot J-P. (1990). Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Volume 2, chapitre 3.3. P295

## *M*

Matamoros. S. (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la bio préservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de doctorat, université de NANTES, faculté des sciences et techniques. Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment Microbiologie. 402p.

Mège J, Laithier C, Le Méns P, Dumas P, Jouvét T, Pédeboy C, Reyrolles et Gaüzère Y. (2004). Guide d'appui technique pour l'accident de fromagerie à la ferme « Les Trous Tardifs » dans les Pâtes Pressées non Cuites. P : 19, 23.

Merigaud J-P, Lemoine T, Aguer D, Beugnot N, Gillis J-C, Jouanneau F, Koubbi L, Lepecheur E, Madiot P, Maupeu prouin J, Simbelie K et Thireau F. (2009). Laits et produits

Metlef et Dilmi-Bouras, (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. P 35. P22

## *N*

Nehal F et Dilmi Bouras A. (2010). Contribution à la caractérisation du pouvoir biotechnologique des *Leuconostocs*. P14

Ninane V-L. (2008). Caractérisation du consortium microbien d'un grain de KÉFIR. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, académie universitaire WALLONIE-EUROPE, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux. 201p.

Nko sadi biatcho D. (2006). Appréciation de la mise en œuvre de l'hygiène dans une laiterie artisanale de Dakar « le dirfel » : de la récolte du lait à sa transformation en lait caillé dit « sow pur ». Thèse de doctorat vétérinaire. Université cheikh ANTA DIOP de Dakar. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. 78p

Noutfia Y, Ibelbachyr M et Zantar S. (2011). Aperçu sur le secteur de fabrication de fromage de chèvre dans la région d'Ouarzazate. Centre Régional de la Recherche Agronomique d'Errachidia, 305-310.

Novello, 2003 : TP de microbiologie : analyse de l'eau. p4, p6

## *O*

Ouadghiri M. (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse de doctorat, université Mohammed V – AGDAL, faculté des sciences Rabat. 132p

## *P*

Prioult G. (1999). Développement d'une méthode en immunofluorescence pour la détection et la quantification de bifidobacterium. Longum et lactococcus lactis ssp. Lactis biovar diacetylactis coï mobilisés dans des billes de gel. P1

Privat. K et Thonart. P. (2011). Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. 339-348.

### *R*

Ramdani Bougussa N, Seghier M, Belouni R et Benslimani A. (2009). Manuel de Microbiologie. 2<sup>ème</sup> Edition 2010. p128

### *S*

Schaeren. W. . Production de lait de chèvre et de brebis: la qualité s'avère payante. **Fiche** technique destinée à la pratique ALP actuel 2007, n<sup>o</sup> 29. 4p.

Soussi C-J, (2010). Enseignement du DU Antibiotiques et antibiothérapie. 166p

Sutra L, Federighi M et Jouve J-L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. P247.

### *T*

Tabak S et Bensoltane A. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. 2011 Octobre ; Oran. Algérie 71-79.

Tabet E. (2009). Etude microbiologiques et physicochimiques des laits caprins et technologie fromagère améliorée. Thèse de doctorat, Université DEGLISTUDI DI SASSARI. 74p

Thiebault C. (2004). Le régime crétois. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université HENRI POINCARE - NANCY 1, Faculté de pharmacie. 122 P

### *W*

Walter S, Maurer J et Walther B. (2010). Un produit de niche prometteur. p. 76-77.

Wehrmüller K. (2006). L'acide lactique dans les aliments et ses effets sur la santé.  
Station fédérale de recherches en production animale et laitière

Wehrmüller K et Ryffel S. (2007). Produits au lait de chèvre et alimentation. ALP actuel 2007, no 28. Fiche technique destinée à la pratique. 4p.

## Y

Yao A A, Egounlety M, Kouame L-P et Thonart P. Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. 2009 Fevrier. 54-65

Yvette S. (2007). Les qualités nutritionnelles du lait et des fromages de chèvre. Les produits laitiers. 1-8.

## Z

Zadi-Karam H, Kalbaza K et Karam N-E. (2011). Identification et caractéristiques technologiques de 18 souches de *Leuconostoc* isolées de lait de chamelle de Béchar. Oran, Algerie. 199p.

Zeller. R. (2005). Le fromage de chèvre : spécificités technologiques et économiques. P9. Thèse de doctorat, école national vétérinaire TOULOUSE, 78p.

## Référence électronique

[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)



# ANNEXE



# Annexe I

## I-1. Matériels :

- **Verreries :**

Pipettes.

Tubes à essais.

Des boîtes de pétries stériles.

Becher

Erlène Meyer

Burette

- **Appareillage :**

Bain marie (Raypa)

Etuve 30°C (memmert, type UM400)

Etuve 37°C (memmert, type UNB 400)

Etuve 44°C (memmert, type BE400)

Autoclave (OMRON, E5C4, H2C)

Four pasteur (Heraeus, type T5028)

PH mètre (Hanna, pH 210)

Réfrigérateur (ENIEM)

Vortex (VELP)

Microscope optique

Rotavapeur (EDWARDS model RV5)

Centrifugeuse (Rotina 380R)

Compteur des colonies (Suntex colony counter 570)

Viscosimètre

- **Réactifs et milieux de cultures :**

Soude Dornic (NaOH N/9), 4,89g/L de NaOH, puis autoclave.

Solution de phénolphtaléine (1g de phénolphtaléine dans 100ml d'éthanol à 95°, puis autoclave).

Ethanol à 95°.

L'eau distillée.

MRS, gélose et bouillon.

MRS à 1% de lait écrémé:100ml de gélose MRS+1g de la poudre de lait écrémé.

MRS à 2% de lait écrémé:100ml de gélose MRS+2g de la poudre de lait écrémé.

Lait écrémé : 100ml d'eau distillée +10g de la poudre de lait écrémé.

Chapman.

BCPL.

EMB

GN

BN

MH

Eau physiologique (9g/L de NaOH) à Ph=7

Rhothe

VF

PCA

## Annexe II

Composition des milieux de cultures:

Milieu MRS gélose (Man; Rosa, Sharpe)

composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1 ml
Hydrogenophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0.2
Sulfate de manganèse	0.05
agar	10

pH =6.2

Autoclave à 120<sup>0</sup>C/20min

Boillon M17

Composition	G /l
tryptone	5
peptone de soja	5
infusion de viande	5
extrait de levure	2.5
acide ascorbique	0.5
sulfate de magnesium	0.25
glycérophosphate disodique	19

pH =6.2

Autoclave à 120<sup>0</sup>C/20min

Eau physiologique :

Composition	g/l
NaCl	9

pH =7.2

Autoclave à 120<sup>0</sup>C/20min

### Bouillon nutritif

Composition	g/l
Extrait de viande	3
Pepton de viande	5

pH =7.5

Autoclave 120<sup>0</sup>C/20min

### Chapmane

Composition	g/l
Extrait de viande	1
NaCl	75
Peptone	10
Agar	15
Manitol	10
Rouge de phénol	0.025

pH =7.5

Autoclave 120<sup>0</sup>C/20min

### Gélose nutritif

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

pH =7.2

Autoclave 120<sup>0</sup>C/20min

## Annexe III

Analyse sensorial de fromage :

Personne n <sup>o</sup>	type de fromage	odeur	gout	aspect	Caractères particuliers	

- (1) Fromage témoin
- (2) Fromageensemencé avec des co-cultures étudiées (*Lactococcus lactis* / *L.mesenteroides ssp cremoris*)

## Annexe IV

Table de Mac Grady :

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules						
0000	0,0	000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,5	001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,5	010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,9	011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,9	020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,6	100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	1,2	101	0,7	221	3,0	321	15,0
110	1,3	102	1,1	222	3,5	322	20,0
111	2,0	110	0,7	223	4,0	323	30,0
120	2,0	120	1,1	230	3,0	330	25,0
121	3,0	121	1,1	231	3,5	331	45,0
200	2,5	130	1,5	232	4,0	332	110,0
201	5,0	200	1,6	300	2,5	333	140,0
210	6,0		0,9	301	4,0		
211	13,0						
212	20,0						
220	25,0						
221	70,0						
222	110,0						

## 5 tubes par dilution

Nombre caractéristique	Nombre de cellules						
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

## Résumé

Cette étude a été réalisée dans le but d'étudier les propriétés technologiques (protéolytique, acidifiante), antagoniste et antibactériennes de quelques souches de *Leuconostoc* et la mise au point d'un fromage frais au lait de chèvre. Au cours de cette étude, trois souches (*Leuconostoc mesenteroides cremoris* "87", *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* : souche B et A) ont montré le meilleur pouvoir acidifiant (un pH allant de 3,94 à 3,98 et une acidité Dornic qui varie entre 53,94 et 63,93). L'étude de l'activité protéolytique effectuée avec l'utilisation de milieux différents (MRS à 1% ou 2% et le lait écrémé à 10%) ainsi que l'étude de l'activité antibactérienne avec l'utilisation de souches cibles pathogènes (*S.aureus*, *Pseudomonas* et *E.coli*), a permis de sélectionner (meilleur pouvoir antibactérien et protéolytique). La souche 87 (*Leuconostoc mesenteroides cremoris*) pour la mise au point de cinq types de fromages frais d'une part, et d'autre part le suivi de l'évolution du pH et la croissance bactérienne dans ces derniers chaque jour pendant 15 jours de conservation à 8°C. Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que la souche *Leuconostoc mesenteroides cremoris* en culture mixte avec *Lc,lactis* pourraient constituer un bon ferment (performances technologiques et bioconservation) pour la fabrication de fromages frais.

**Mots clés :** *Leuconostoc*, lait de chèvre, *Lactococcus lactis*, pouvoir acidifiant, fromage frais, pouvoir antibactérien, pouvoir protéolytique.

## Summary

This study was conducted to examine some technological properties (proteolytic, acidifying and antagonist) and antimicrobial few strains of *Leuconostoc* and the development of a fresh cheese from goat's milk, during this study, three strains (*Leuconostoc cremoris* "87", *Leuconostoc mesenteroides ssp: curd and 176*) have shown the best power acidifying (pH ranging from 3.94 to 3.98 and a Dornic acidity ranging between 53.94 and 63.93) . The study of the proteolytic activity performed with the use of different media (MRS to 1% or 2% milk and eCrime 10%) and the study of antibacterial activity with the use of target pathogenic strains ( *S. aureus*, *Pseudomonas* and *E. coli*), was used to select (to better antibacterial and proteolytic) strain 87 (*Leuconostoc cremoris*) for the development of five types of fresh cheese on the one hand, and other followed by the evolution of pH and bacterial growth in these every day for 15 jous storage at 8 ° C. The results obtained at the end of this work show that the strain *Leuconostoc cremoris* in mixed culture with *L lactis* pourraient be a good starter (and technological performance bioconservation) for the manufacture of fresh cheeses

**Keywords:** *Leuconostoc*, goat milk, *Lactococcus lactis*, acidifying power, fresh cheese, antibacterial, proteolytic power.