République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université A.MIRA-BEJAIA

Faculté : **Sciences de la Nature et de la Vie**
Filière : **Sciences Biologiques**
Département : **Microbiologie**
Spécialité **: Microbiologie Alimentaire et Santé**

Réf :.....

Mémoire De Fin De Cycle

En Vue De L'obtention Du Diplôme

MASTER

Thème

Mise au point d'un l'ben artisanal en incluant des ferments isolés localement

Présenté par :

ABBACI Sassi

MEHENNI Mohand Said

Soutenu le : 20/06/2017

Devant le jury composé de :

M^me^ BOUKTITE N.	MAA	Président
M^r^ BENDJEDDOU K.	MCB	Examinateur
M^me^ FARRAJI-HAMMA S.	MCB	Encadreur

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Avant tous nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre enseignante et promotrice Madame ***FARADJI-HAMMA .S*** *d'avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide compétente qu'elle nous a apporté, pour sa confiance, son encouragement et son œil critique qui nous a été très précieux pour améliorer la qualité de notre mémoire. L'apport de ses sincères soutiens ne s'est pas limité au cadre formel du travail, mais a été une grande source de motivation pour continuer et accomplir ce travail. Veuillez trouver ici madame l'expression de nos sincères reconnaissances.*

Nos remerciements les plus vifs vont à notre enseignante Madame BOUKTITE.N d'avoir consacré son précieux temps à juger ce manuscrit en présidant le jury.

Nous tenons à présenter toute notre gratitude envers Monsieur BENJDEDDOU.K pour son dévouement afin d'estimer ce travail, il a tout notre respect pour cela.

Nos remerciements vivement les responsables de l'unité GipLait (Amizour), de nous avoir offert l'opportunité d'effectuer des prélèvements du lait ainsi de faire des analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait au sein de leur entreprise et tout le personnel du laboratoire pour leur aide technique et scientifique. Egalement la responsable du laboratoire GipLait Mme AOULI.CH, de nous avoir fait confiance et pour son aide.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Au nom du Dieu tout puissant, à qui je dois tout, et surtout d'avoir honoré et éclairé mon chemin par le savoir

A la mémoire de mon cher père, son dynamisme et son amour me manqueront à tous jamais, que Dieu l'accueil dans son vaste paradis

A mon adorable chère mère source d'affectation de courage et d'inspiration qui a tant
Sacrifié pour me voir atteindre ce jour.

A mes deux sœurs FADHILA et RAZIKA, mes frères, MOKRANE. RACHID, MABROUK, LOUCIF, SALIM et TARIK

A mes neveux et nièces.

A mes cousines et cousins

Sans oublier Mon cher binôme : HAMOU ainsi toute sa famille.

A mes amis :jimou ,kouka, wissem, fatiha.

A tous les étudiants de la promotion Microbiologie Alimentaire Santé 2016/2017.

Et à tous ceux qui me sont chers.

SASSI

Dédicaces

Spécialement à mon père À qui je dois énormément, qui a cru en moi et qui m'a donné les moyens d'aller aussi loin. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mes très chères sœurs :djida ,chahinaz les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A mes très chères frères :aissa et saadi Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

. Pour finir j'adresse mes remerciements à mes très chers amis qui sont devenus des frères et sœurs pour moi :moukran,amir,djimou ,kouka ,fatiha,wissam ,farouk et autres, pour leurs conseils et leurs soutiens sans faille.

Mohand Said

Liste des abréviations

GN : gélose nutritive

NaCl: chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

Lc : *Lactococcus*

Lb : *Lactobacillus*

Ln : *Leuconostoc*

Ac : acide

CFU/ml : Unité formant colonie par millilitre

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile

JORA : Jornal Official de la République Algérienne

CSR : Clostridium Sulfito-Reducteur

S.aureus : Staphylococcus aureus

St : Streptococcus

pH : Potentiel d'Hydrogene

V : Volume

UFC : Unité Formant Colonie

MG : Matiére Grasse

°D : Degré Dornic

AT : Acidité titrable

BL : Bactéries Lactique

AFNOR: Association Française de Normalisation

FAO/OMS: Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

FAO: Food and Agriculture Organization

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I: Principaux caractères des bactéries lactiques 3

Tableau II : Principaux genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques..... 4

Tableau III : Flore originelle du lait cru 7

Tableau IV : Principaux constituants chimiques du lait cru de vache..... 7

Tableau V : Principaux caractéristiques physique-chimique du lait cru de vache..... 8

Tableau VI: Composition chimiques par 100g..... 9

Tableau VII: Propriétés physiques du l'ben 9

Tableau VIII : composition microbiologique du l'ben. 9

Tableau IX : les origines des 18 souches de bactéries lactiques. 12

Tableau X : l'origine des les souches pathogènes 13

Tableau XI : Dénombrement ou recherche des germes dans le lait cru 18

Tableau XII : Techniques de dénombrement sur milieux solides.....21

Tableau XIII : Résultats de la revivification et purification des 18 souches lactiques.....22

Tableau XIV : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes (teste de spot).....28

Tableau XV: Résultats d'analyses physico-chimiques du lait cru de vache.....30

Tableau XVI : Temps de maturation de l'ben pour atteindre le caillage. 33

Tableau XVII : Résultats d'analyse physico-chimique du L'ben 34

Liste des tableaux en annexe

Tableau I : Résumé de l'observation microscopique des 18 souches de LAB

Tableau II : La cinétique d'acidification (pH) des souches lactiques.

Tableau III : Evolution de l'acidité Dornic des souches lactiques.

Tableau IV : La variation du pH (Δ pH) des souches lactiques

Tableau V : Les résultats de pH du lait inoculé par des souches lactiques en culture mixte

Tableau VI: résultats de l'acidité Dornic dans le lait pour les souches lactiques en culture mixte.

Tableau VII: la variation du pH (Δ pH) des souches lactiques en culture mixte.

Tableau VIII : résultats de la standardisation des souches lactique utilisées

Tableau IX : résultats de la standardisation des souches pathogènes.

Tableau X : résultats d'analyse microbiologique du lait cru

Tableau XI : résultats du suivi microbiologique du l'ben1
Tableau XII : résultats du suivi microbiologique du l'ben2.
Tableau XIII : résultats du suivi microbiologique du l'ben3

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels (Benkerroum et Tamime, 2004)..... **10**

Figure 2 : Schéma de fabrication industrielle d'un l'ben au niveau d'une laiterie. **12**

Figure 3 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic du lait ensemencé par les souches de *Lactobacillus* **24**

Figure 4 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic du lait ensemencé par les souches de *Leuconostoc*..... **25**

Figure 6 : Résultats du suivi de pH et de l'acidité Dornic des cultures mixtes des souches lactiques..... **27**

Figure 7 : Résultats du suivi de l'acidité Dornic des cultures mixtes des quatre souches lactiques..... **27**

Figure 8 : Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache. **32**

Figure 9. Dénombrement de la flore mésophile totale sur le milieu P.C.A à 30°C. **32**

Figure 10 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben1 en fonction du temps..... **37**

Figure 11 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben2 en fonction du temps..... **37**

Figure 12 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben3 en fonction du temps..... **37**

Liste des figures en annexes

Figure 1: Standardisation de l'inoculum de Bactéries lactiques et pathogènes.

Figure 2 : Test des spots

Figure 3 : Photos du lait de vache utilisé dans la mise au point du l'ben artisanal

Figure 4 : Maturation du l'ben

Sommaire

Sommaire

Introduction……1

Synthèse bibliographique

I. Les Bactéries lactiques 3
I .1. Généralités sur Les Bactéries lactiques 3
I.2. Les propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques 4
I.2.1. Activité acidifiante 5
I.2.2. Activité protéolytique 5
I.2.3. Activité lipolytique 5
I.2.4. Activité aromatisante 5
I.2.5. Formation des exopolysaccharides 6
I.3. Rôle probiotique : 6
II. Le Lait et lait fermenté 6
II.1. Le lait cru 6
II.2. Lait cru de vache 7
II.2.1. Qualité microbiologique du lait 7
II.2.2. Qualité physico-chimique du lait cru 7
II.3. Laits fermentés 8
II.3.1. L'ben 8
II.3.1. Valeur nutritionnelle du L'ben 8
II.3.2. Propriétés physico-chimiques du L'ben 9
II.3.3. La microbiologie du l'ben 9
II.3.4. Procédées de fabrication 10

Matériel et méthodes

1. L'origine des souches 12
2. Revivification des souches 13
3. Vérification de la pureté des souches 13
La vérification de la pureté est faite avant toute utilisation des souches. 13
4. Préparation du lait écrémé stérile 13
5. Standardisation des bactéries lactiques 13
6. Standardisation des souches pathogènes 14

Sommaire

7. Préparation des pré-ferments 14
8. Etudes du pouvoir acidifiant 14
8.1. Cinétique d'acidification des cultures pures 14
8.1.1. Suivi du pH au cours de la croissance. 14
8.1.2. Suivi de l'acidité titrable 14
8.2. La cinétique d'acidification des cultures mixtes 15
8.2.1. Préparation des associations 15
8.2.2. La cinétique d'acidification des cultures mixtes 15
9. Le pouvoir antibactérien des souches sélectionnées 15
9.1. Test des spots 16
II. La mise au point d'un l'ben 16
II.1.Echantillonnage 16
II.2. Analyse du lait de vache cru 17
II.2.1. Analyse physico-chimique 17
II.2.1.1. Détermination de la densité 17
II.2.1.2. Détermination de l'acidité Dornic 17
II.2.1.3. Mesure du pH 17
II.2.1.4. Matière grasse 17
II.2.2. Analyses microbiologiques 18
II.2.2.1. Analyses effectuées 18
II.3. La mise au point du l'ben artisanal 20
II.3.1. Les étapes de préparation de l'ben 20
II.3.2. Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique du l'ben au cours de la conservation. 20

Résultats et discussions

1. La pureté des souches 22
2. Standardisation des souches 22
I. Le pouvoir acidifiant 23
I.1. Cinétique d'acidité des cultures pures 23
I.2. La cinétique d'acidification en cultures mixtes 26
II. Le pouvoir antibactérien des souches sélectionnées 28
II.1. Teste des spots 28
III. La mise au point du l'ben 30

Sommaire

III.1. Analyse physico-chimique du lait 30
III.2. Analyse microbiologique du lait 31
III.2.1. La flore totale aérobie mésophile 31
III.2.2. Les bactéries lactiques 32
III.2.3. Levures et Moisissures 32
III.2.4. Les Coliformes totaux et fécaux 33
III.2.5. Les Streptocoques totaux et fécaux 33
III.2.6. Salmonelles 33
III.2.7. Staphylocoques 33
III.2.8. Clostridiums sulffito-réducteurs 33
II.3. La préparation du l'ben 34
II.3.1. Le temps de maturation 34
II.3.2. Le suivi physico-chimique 34
III.3.3. Le suivi microbiologique 36
III.3.3.1. La flore totale aérobie mésophile 37
III.3.3.2. La flore lactique 38
III.3.3.3. Levures et moisissures 38
III.3.3.4. Les coliformes totaux 39
Conclusion 40

Introduction

L'Algérie est un pays traditionnellement consommateur de produits laitiers fermentés, qui étaient jusqu'à une date récente fabriqués en milieu rural, principalement pour l'autoconsommation, par fermentation spontanée des laits crus produits localement. L'urbanisation a transformé les mondes de production, rendant l'ajout de levains incontournable, en premier lieu celui de levains lactiques. En effet, l'amélioration de la qualité du lait et des laits fermentés (l'ben et j'ben) surtout traditionnels est devenue l'objectif, par la mise en place d'une réglementation à différents niveaux de la production (**Benkeroum et Tamine, 2004).**

Actuellement les industries laitières sont en effet très concernées par l'utilisation des bactéries lactiques comme agents de transformation pour l'obtention de laits fermentés et la réduction des microflores d'altérations et des flores pathogènes. Car la suppression de la microflore du lait cru par d'autres techniques tels que la microfiltration, la pasteurisation, …entraine une diminution du goût et des différences dans les arômes des fromages **(Bouton et Grappin., 1995).**

La propagation empirique des levains lactiques a conduit à l'utilisation d'associations complexes de bactéries lactiques. La possibilité de produire des souches pures permettrait de les associer de façon raisonnée suivant des critères technologiques (vitesse d'acidification, activité texturante, qualité aromatique, activité antibactérienne…), ou mieux de les produire en mélange en contrant leur qualité (**Juillard et *al.*, 1987).**

D'ailleurs, la production du l'ben est basée sur l'utilisation des ferments constitues de souches mésophiles qui permettent l'obtention d'un produit de qualité organoleptique et microbiologique acceptable.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude portant sur :

- L'évaluation des propriétés acidifiantes de 18 souches de bactéries lactiques en cultures pures.
- La sélection de souches les plus acidifiantes pour l'étude de leurs propriétés acidifiantes en cultures mixte.
- Caractérisation de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées.
- Application des souches sélectionnées dans la mise au point d'un lait fermenté artisanal type l'ben,

- Suivi d'une analyse physico-chimique et microbiologique pendant sa conservation à 6°C.

Synthèse bibliographique

I. Les Bactéries lactiques

I .1. Généralités sur Les Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes et hétérotrophe. (**Dellagolio *et al.*, 1994**).

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini par Horla Jensen (1919), comme étant des bactéries caractérisées par leur capacité à fermenter les glucides en empruntant l'une des deux voie : soit homolactique (production seulement d'acide lactique), ou bien, hétéro lactique (production d'acide lactique, éthanol, acide acétique, dioxyde de carbone…..etc.). Ces bactéries présentes d'autres caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement. Ce sont des bactéries Gram positif, elles sont dépourvues de catalase, d'oxydase et de nitrate-réductase. (**Leveau *et al* .,1993**). Les principaux caractères des bactéries lactiques sont résumés dans le tableau **I.**

Tableau I: Principaux caractères des bactéries lactiques **(Badis et *al*.,2005)**

Principaux caractères des bactéries lactiques	
Forme	Coque ou bacille
Coloration	Gram+
Type de respiration	Micro-aérophile ; anaérobie facultatif
Type de fermentation	Homofermontaire ou hétéro fermentaire
Spore	Asporulé
Mobilité	- A l'exception de quelques espèces du genre *vagococcus*
Catalase	-
Oxydase	-
Nitrate-réductase	-
Exigences nutritionnelles	Glucide fermentescible Acide gras Acide aminés Peptides vitamines et sels minéraux

Les bactéries lactiques regroupent 13 genres importants les plus étudiés dont *: Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus , Streptococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus. (***Dortu, 2009*).**

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Enterococcus et Pediococcus* (**Drouault et Corthier, 2001). (Tableau II)**

Tableau II : Principaux genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques **(Laurent *et al*., 1998)**.

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces	Nom d'espèces
Lactobacillus	Bacilles	Homo ou heterofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22	*Lb.acidophilus* *Lb.plantarum* *Lb.kefir*
Lactococcus	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5	*Lc.cremoris* *Lc.lactis*
Streptococcus	Coques	Homofermentaires	mésophiles ou thermophiles	19	*Streptococcus thermophillus*
Leuconostoc	Coques	Heterofermentaires	Mésophiles	11	*Ln.lactis* *Ln.pseudomesenteroides*
Bifidobacterium	forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25	*Bifidobacterium bifidum*

I.2. Les propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques

Le champ d'application des bactéries lactiques est large et plusieurs de leurs propriétés sont importantes et influentes sur la qualité finale des produits alimentaires. Il permet d'assurer la qualité sensorielle des produits et de mieux maîtriser le processus de fermentation (**Muthukumarasamy *et al*., 2006).**

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : Activité acidifiante, propriétés enzymatiques, les activités protéolytiques et l'activité lipolytique **(Wouters *et al*., 2002).**

I.2.1. Activité acidifiante

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, les bactéries lactiques provenant des matières premières, de l'environnement ou de l'animal sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone.

Dans la fermentation homolactique, l'acide lactique est le produit prépondérant (plus de 95%). Il provient de la réduction de l'acide pyruvique catalysée par la lactate déshydrogénase. (**Badis *et al*., 2004).**

I.2.2. Activité protéolytique

Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait**. (Savijoki *et al* ., 2006) .**

La protéolyse est le phénomène le plus complexe et le plus important de la maturation des fromages; elle est subdivisée en deux étapes:

a. Protéolyse primaire : C'est une hydrolyse spécifique des caséines qui est influencée par la concentration, la rétention d'eau, l'activité des enzymes elle-même et le pH **(Kalit *et al*., 2005).**

b. Protéolyse secondaire : Correspond à l'hydrolyse des gros peptides par l'action des protéinases et des peptidases qui donnent des peptides plus courts et des acides aminés**.** (**Kalit ., et *al*., 1981**).

En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur les protéines myofibrillaires. Les peptidases issues des bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (**Ammor *et al*.,2005).**

I.2.3. Activité lipolytique

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acide gras libre des produits fermentés, réduisant de ce fait la durée de leur maturation mais sans en améliorer systématiquement leur saveur **(Zalacain *et al.*, 1996).**

Stackebrandt *et al*., 2002 ont montré que la lipolyse est relativement faible chez les ferments lactiques.

I.2.4. Activité aromatisante

Les composés aromatiques rencontrés dans les produits fermentés peuvent être répartis en quatre classes (**Morales et *al*., 2003**) :

- Les acides non volatils : acide lactique succinique pyruvique, oxalique.
- Les acides volatils : acide acétique, formique, propionique, butyrique.
- Les composés carbonylés : acétaldéhyde, diacétyle, acetoine.
- Composés divers : alcools esters…

I.2.5. Formation des exopolysaccharides

La plupart des microorganismes synthétisent les polysaccharides. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule. D'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de

polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire". Deux types d'EPS, soit excrété dans le milieu environnant, soit liés à la surface de la cellule sous forme de capsule, ils peuvent être produits par certaines bactéries lactiques (Ai *et al.*, 2008).

Parmi les expolysaccharides produits, le monosaccharide le plus présent est le D-galactose, puis le D-glucose, et en petite quantité le L-rhamnose (**De vuyst *et al*., 2003**).

I.3. Rôle probiotique :

Les probiotiques sont « des microorganismes vivants, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, procurent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte » **(AFSSA, 2005).**

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. Les probiotiques doivent être capables de moduler la réponse immunitaire et/ou produire des substances antimicrobiennes. Ils doivent être aussi capables de survivre et de proliférer dans les milieux naturels occupés par des bactéries pathogènes **(Heyman et *al*., 2006)**.

Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés probiotiques sont très utiles à la santé, En effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale (**Gorbach, 1996**).

Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les deux principales souches de bactéries probiotiques utilisées dans les produits alimentaires **(Heyman et *al*., 2006)**.

Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la Suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin, du niveau de substances carcinogènes, et de l'inactivation de composés toxiques **(Bottazzi, 1994)**. Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque **(Heyman et *al*., 2006)**.

II. Le Lait et lait fermenté

II.1. Le lait cru

Le lait est une sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites sans y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (**FAO, 2001**).

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, indispensable pour le nouveau-né, comme il s'avère très bénéfique pour l'adulte. Il constitue un milieu propice pour la

croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (**Chye *et al.*, 2004*)***

II.2. Lait cru de vache

Le lait sans indication de l'espèce animal de provenance correspond au lait de vache (**Larpent, 1997**).

II.2.1. Qualité microbiologique du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) **(Larpent, 1997).**

le matériel de traite, la litière, la qualité de l'air et les pratiques des éleveurs (**Sevi *et al.*, 1998, 2003 ; Ménard *et al.*, 2004)** sont des sources de contamination. La colonisation du lait par des microorganismes n'a été que partiellement décrite. Seuls les microorganismes pathogènes ont été souvent considérés **(Wareing, 2005).**

Tableau III : Flore originelle du lait cru **(Vignola, 2002)**

Microorganismes	**Nombre en pourcentage**
Micrococcus sp.	30-90
Lactobacillus	10-30
Streptococcus ou lactococcus	<10
Gram négatif	<10

II.2.2. Qualité physico-chimique du lait cru

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme, et aux jeunes mammifères un aliment presque complet. Protides, lipides, sels minéraux, et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes, pour la croissance, et la multiplication cellulaire **(Larpent, 1991).**

Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, de la traite ou de l'allaitement. Elles sont aussi tributaires de la nature de l'alimentation des animaux **(Coulon et *al.*, 1995).**

Les principales propriétés du lait cru sont représentées dans les tableaux (IV et V).

Tableau IV : Principaux constituants chimiques du lait cru de vache. **(Dillon, 2008).**

Composants		**Composition moyenne du lait cru de vache en g/l**
Eau		900
Extrait sec		130
Matière grasse		35-40
Protéines	Totaux	30-35
	Caséine	27-30
	Albumines	3-4
Glucides (lactose)		45-50
Matière minérale		8-10

La composition et les caractéristiques physico-chimiques du lait cru varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races **(Rahali et Ménard, 1991; Soryal et *al*., 2004)**.

Tableau V : Principaux caractéristiques physique-chimique du lait cru de vache **(bourgeois *et al*., 1990)**

Caractéristiques	**Valeurs**
pH (à 20°C)	6,6
Densité	1,030-1,033
Température de congélation (°C)	-0,55
Acidité dornic (°D)	16-18
Indice de réfraction (à 20°C)	1,35
Point d'ébullition (°C)	100,16

II.3. Laits fermentés

Les laits fermentés sont des produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait (Béal et Sodini, 2012). Leur nature dépend du type de lait utilisé, le prétraitement, les conditions de fermentation et le traitement ultérieur (**Zamfir *et al*., 2006**).

C'est un moyen peu coûteux et une technologie qui préserve les aliments, améliore leurs valeurs nutritives et améliore leurs propriétés sensorielles (**Marty et Kummar, 1995).**

Elle peut également conduire à la désintoxication, la destruction d'éléments indésirables présents dans les aliments crus comme le cyanure, les tanins et les polyphénols (**Blandino *et al*., 2003**) et aussi à la dégradation du lactose (**Fox et Thomson, 2007 ; Schaasfsma, 2008**).

II.3.1. L'ben

Le l'ben est une boisson préparée par fermentation spontanée du lait cru jusqu'à coagulation, suivi d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus ou moins importante de matière grasse sous forme de beurre (**Tantaoui-Elaraki *et al* ., 1983).**

II.3.1. Valeur nutritionnelle du L'ben

Le l'ben est apprécié pour ces qualités organoleptiques rafraichissantes et sa valeur nutritionnelle importante car il ne diffère du lait que par le léger mouillage dont il fait l'objet, par élimination d'une quantité variable de la matière grasse, et par la fermentation d'une partie du lactose. Il est probable que la fraction azotée ne subit pas de modification sensible au plan nutritionnelle, et que le développement microbien entraîne même un enrichissement en certaines vitamines (**Tantaoui-Elaraki et *al*., 1983**).

La fermentation du lait par des micro-organismes particuliers peut conduire à la désintoxication, la destruction d'éléments indésirables présents dans les aliments crus comme le cyanure, les tanins et les polyphénols **(Blandino et *al*., 2003)** et aussi à la dégradation du lactose **(Fox et Thomson, 2007 ; Schaasfsma, 2008).**

II.3.2. Propriétés physico-chimiques du L'ben

La composition chimique du « L'ben » est variable, elle dépend des localités, des régions, des fermes, de la composition chimique du lait cru de départ et de la procédure de fabrication (**El Baradei *et al*., 2008**). **(Tableau VI et VII).**

Tableau VI: Composition chimiques par 100g (**Benkerroum et Tamine, 2004**).

Composition	**Quantités**
Protides	2,9g
Glucides	4,9g
Lipides	1,0g
Potassium	153mg
Calcium	112mg
Sodium	45mg
Magnésium	10,6mg
Phosphates	86mg

Tableau VII: Propriétés physiques du l'ben **(Tantaoui-Elaraki et *al* ., 1983**).

pH	4,2
Acidité Dornic	8,2g en acide lactique
Matière sèche totale	89g /l

II.2.3. La microbiologie du l'ben

✓ La microflore originelle

La flore microbienne impliquée dans la fermentation du lait pour la production du l'ben est composée de bactéries lactiques mésophile, responsable de la fermentation lactique et le développement d'aromes caractéristiques du l'ben (**Ouadghiri, 2009**).

Les espèces dominantes dans le « L'ben », sont *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* et subsp. *lactis*, les *Lactobacillus* spp. sont présents à de faibles nombres **(Tantaoui-Elaraki *et al* (1983a). (Tableau VIII)**

Tableau VIII : composition microbiologique du l'ben (**Ouadghiri, 2009**).

Espèces	**Pourcentage (%)**
Lactococcus lactis	41
Leuconostoc pseudomesterides	36
Lactobacillus plantarum	15
Leuconostoc mesenteroides	5

✓ La microflore de contamination

Les coliformes, streptocoques fécaux, déterminent la qualité hygiénique du produit (**Tantaoui-Elaraki *et al* ., 1983**).

L'homme, l'animal et l'environnement peuvent contaminer le l'ben par des microorganismes pathogénes : *Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Esherichia coli, Salmonella sp* et certaines moisissures. (**Vignola, 2002**).

II.2.4. Procédées de fabrication

✓ Artisanale

Sa préparation artisanale est simple **(figure1)**, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume de lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre **(Benkerroum et Tamime ; 2004,Ouadghiri, 2009)**.La figure 1 résume le procédé de fabrication artisanal du l'ben.

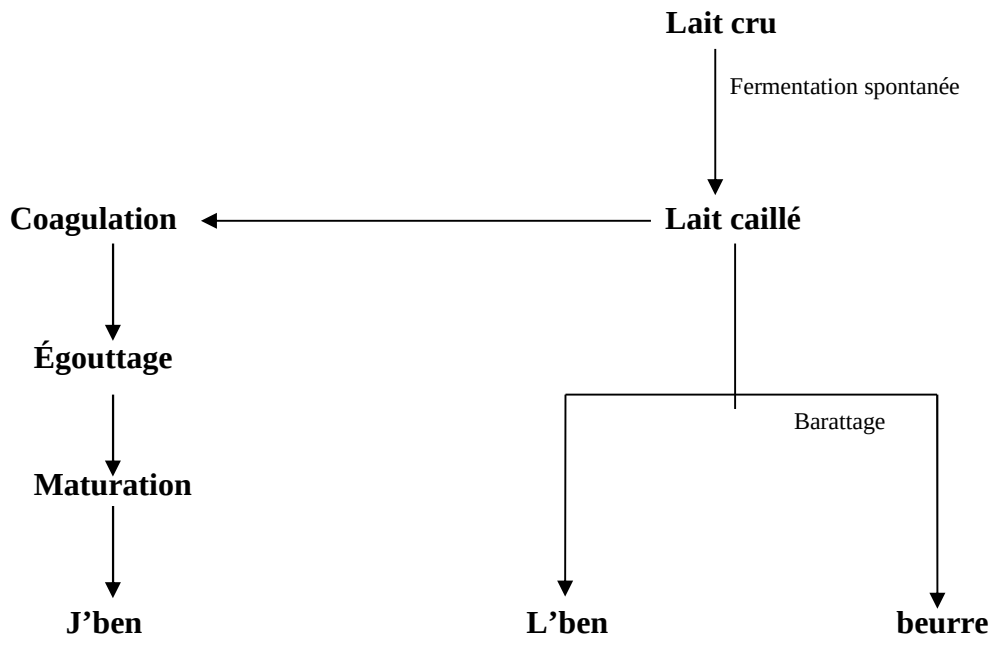

Figure 1. Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels (**Benkerroum et Tamime, 2004).**

✓ Fabrication industrielle

Le l'ben industriel est souvent préparer (figure 2) à partir du lait partiellement ou totalement écrémé. Dans les pays où la production laitière est faible, du lait reconstitué est fréquemment utilisé (1Kg de poudre de lait écrémé pour 10L d'eau).Le produit finale est l'égerment acide et au gout agréable peut se conserver une semaine à 6°C (**benkerrouma et Taminme, 2004**).

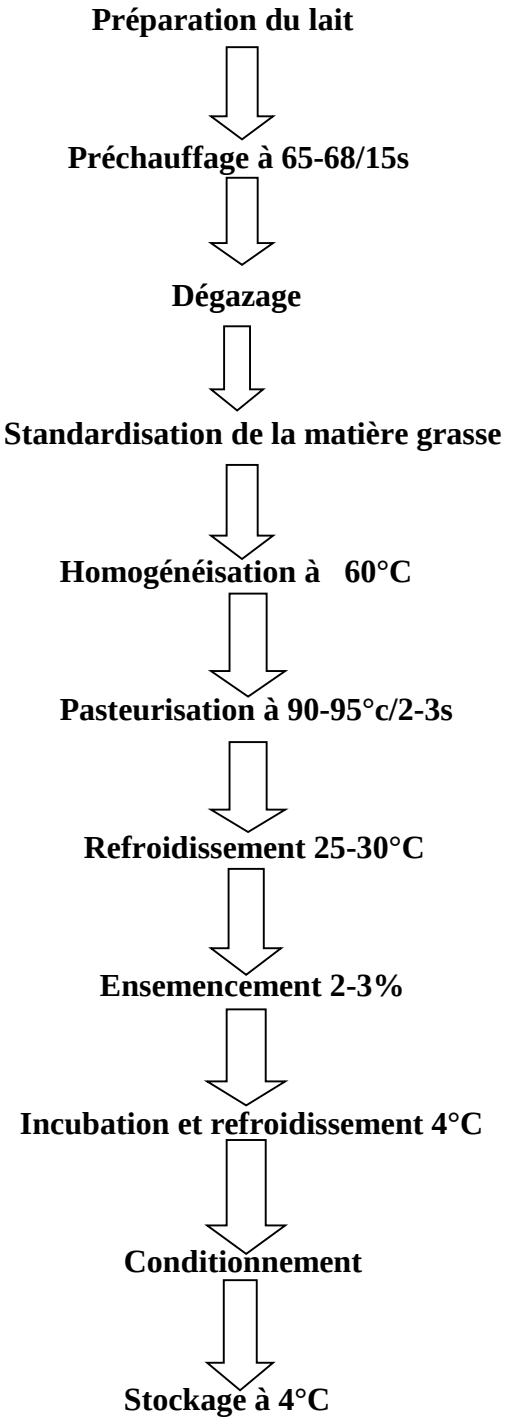

Figure 2 : Schéma de fabrication industrielle d'un l'ben au niveau d'une laiterie.

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie 1 (bloc 9) de l'université Abderrahmane Mira sous la direction de Madame Faradji-Hamma S dans le but d'une mise au point d'un L'ben artisanal en incluant des ferments lactiques isolés localement sélectionnés pour leurs pouvoirs acidifiant et l'activité antibactérien.

1. L'origine des souches

Dix-huit souches de bactéries lactiques ont été utilisées dans cette étude, elles sont isolées par le Dr.FARADJI. **(Tableau IX**). Les souches pathogènes utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne appartiennent à la collection du Laboratoire LMA **(Tableau X)**

Tableau IX : les origines des 18 souches de bactéries lactiques.

Code et origine des souches	Genre
Lb 1 S : 02 MRS Tichy	*Lactobacillus*
Lb 2 S : 06 MRS pk7	
Lb 3 : MRS	
Lb 4 : MRS	
Lb 5 : MRS	
Lb 6 S : 01 MRS Amizour	
Lb 7 S : 02 MRS Adekar	
Lb 8 S : 03 MRS Adekar	
Lb 9 S : A Adekar	
Ln 1 S : 03 LK	*Leuconostoc*
Ln 2 S : 01 MRS Kindira	
Ln 3 S : 01 MRS	
Ln 4 S : 01 MRS Sétif	
Lc 1 S : 03 MRS pk7	
Lc 2 S : 04 MRS Toudja	*Lactococcus*
Lc 3 S : 03 MRS faraoun	
St S : 02 MRS pk7	*Streptococcus*
P S : 01 M_{17} pk7	*Pediococcus*

Tableau X : l'origine des les souches pathogènes

Souches	Origines
S.aureus	L'ben
E.coli* ATCC *25922	Souche de référence
Proteus sp	Infection urinaire
En.cloacae	Infection urinaire
K.pneumoniae	Infection urinaire

2. Revivification des souches

La revivification des souches consiste à transférer 1ml de chaque souche (préalablement conservées à -20°C) dans des tubes contenant 9 ml de bouillon (MRS pour les bactéries lactiques, nutritif pour les bactéries pathogènes) additionné de glycérol. Ces bouillons sont incubés respectivement à 30°C pour les bactéries lactiques et à 37°C pour les bactéries pathogènes. Cette opération est répétée au moins trois fois a fin d'obtenir des cultures fraiches.

3. Vérification de la pureté des souches

La vérification de la pureté est faite avant toute utilisation des souches.

Après le repiquage, la pureté est vérifiée en réalisant quelques tests rapides et simples.

- Observation de l'aspect des colonies après isolement sur gélose MRS à l'œil nu.
- Réalisation de la coloration de Gram.
- Teste de catalase

4. Préparation du lait écrémé stérile

Pour préparer un litre du lait écrémé à 8%, 100 g de la poudre de lait à 0% de matière grasse (Giplait) est mélangé à 1000 ml de l'eau distillé répartis dans des flacons de capacité de 250ml. Le lait est stérilisé à 110°C pendant 10 minutes.

A fin de tester la stérilité du lait, un flacon est incubé dans l'étuve à 37 °C pendant 48h.

5. Standardisation des bactéries lactiques

Après revivification des souches, un isolement par stries de chaque souche de BL sur la gélose MRS est effectué. Après incubation à 30°C et à 37°C selon la souche durant une période de 48h, six colonies identiques et bien isolées de chaque souche sont repiquées dans 9ml du lait écrémé stérile. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 24h.

Des dilutions décimales jusqu'à 10^{-10} sont réalisées dans de l'eau physiologique. suivi d'un ensemencement sur gélose MRS. Un dénombrement des colonies a été réalisé **(Figure 1, annexe III).**

6. Standardisation des souches pathogènes

Après revivification des souches pathogènes, un isolement par stries de chaque souche sur la gélose nutritive est effectué. Après incubation à 37°C, une colonie bien distincte de chaque souche est inoculée dans le bouillon nutritive. Ces dernières sont incubées à 37°C pendant 18h.

Des dilutions décimales jusqu'à 10^{-10} sont réalisées dans de l'eau physiologique. Suivi d'un ensemencement sur gélose nutritif. Un dénombrement des colonies a été réalisé. **(Figure 2, annexe III)**

7. Préparation des pré-ferments

A partir des cultures pures de 48h isolées sur gélose MRS, 1ml (10^9UFC/ml) de chaque souche de bactéries lactiques sont introduites aseptiquement dans 9 ml de lait écrémé stérile. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 48h.

8. Etudes du pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures pures en fonction du temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h) et d'autre part à doser simultanément l'acidité Dornic.

8.1. Cinétique d'acidification des cultures pures

Pour cette étude, une série de tubes de 9 ml du lait écrémé stérile sont préparés. Chaque tube a été ensemencé par 1 ml de pré-ferment des cultures pures.

8.1.1. Suivi du pH au cours de la croissance.

Le suivi du pH des différentes cultures pures à été réalisé chaque 2 heurs pendant 6 heurs, après 24 heures et après 48 heures. Les mesures du pH ont été réalisées par le pH-mètre à une température de 20 °C en plongeant l'électrode dans le volume du lait

8.1.2. Suivi de l'acidité titrable

Mesure de l'acidité Dornic par le titrage de la soude (NaOH) (1/9N) en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine à 1% **(annexe I),** jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes.**(Larpent, 1997)**.

L'acidité est déterminée par la formule :

Acidité (°D) = V NaOH x 10

Où :

VNaOH: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

8.2. La cinétique d'acidification des cultures mixtes

Afin d'étudier le pouvoir acidifiant en culture mixte, une sélection de souches les plus acidifiantes a été réalisée. Des combinaisons ont été préparées à partir de ces dernières.

8.2.1. Préparation des associations

L'association des bactéries lactiques repose sur le choix de l'utilisation de quatre souches pures ayant le meilleur pouvoir acidifiant qui sont : deux souches de *Lactobacillus* (Lb4 et *Lb7),* une souche de *Leuconostoc*(*Ln1*) et une souche de *Lactococcus*(*Lc1).*

Des pré-ferments des quatre souches sélectionnées sont préparés afin d'étudier le pouvoir acidifiant en culture mixte.

Les cultures ont étés préparées par les combinaisons suivantes

- La culture mixte n°1 :Ln1/Lc1/Lb4
- La culture mixte n°2 :Ln1/Lc1/Lb7
- La culture mixte n°3 :Ln1/Lb4/Lb7
- La culture mixte n°4 :Lc1/Lb4/Lb7

Les cultures des bactéries lactiques ont été utilisées à des valeurs égales dans des tubes de 7 ml de lait écrémé stérile, on a associé 1ml (10^9UFC/ml) de pré-ferment de chaque souche

8.2.2. La cinétique d'acidification des cultures mixtes

Afin de sélectionner la culture mixte la plus acidifiante. L'étude du pouvoir acidifiant (pH et mesure de l'acidité Dornic) chaque heure pendant 6h après 24h et 48h des différentes cultures mixtes a été réalisée. Le même protocole utilisé pour l'étude du pouvoir acidifiant des cultures pures est suivi **(page 12)**.

9. Le pouvoir antibactérien des souches sélectionnées

Pour les tests de criblage de l'activité antibactérienne, les souches de BL sélectionnées selon leur pouvoir acidifiant ont été testées à l'égard de cinq souches pathogènes **(Tableau II annexe I)**. Pour cette étude le test de spots est utilisé.

9.1. Test des spots

Les souches de bactéries lactiques sont sélectionnées pour leurs aptitudes à inhiber les souches pathogènes en utilisant la méthode décrite par **Fleming et *al*. (1975)**: 5 µl d'une culture de 18h de souches lactiques(10^9UFC/ml), en bouillon MRS , sont déposés en spots sur des boites de Pétri préalablement coulée avec la gélose MRS et solidifiée. Les boites sont laissées à sécher autours du bec Bunsen pendant 10 min, puis sont incubées à leur température optimale de croissance 30°C ou à 37°C selon la souche pendant 18h. Après incubation les spots sont recouverts avec 9 ml de la gélose nutritive (GN) en surfusion inoculés avec 1ml d'une culture de 18h de la souche cible avec une concentration finale de 10^6UFC/ml. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure des diamètres de zones d'inhibitions après 18h d'incubation à 37°C **(Figure 2, annexe III).**

II. La mise au point d'un l'ben

Pour la mise au point d'un l'ben artisanal, un lait de vache cru de la région de Samaoun commune d'Amizour est utilisé.

II.1.Echantillonnage

Deux litres de lait cru prélevés directement d'un collecteur de la région de Samaoun au niveau de la laiterie GipLait d'Amizour et un litre du même lait de vache après pasteurisation **(Figure 3, annexe IV)** à une température de 90 à 95°C pendant 2 à 3 seconds au niveau de la laiterie GipLait d'Amizour.

Les échantillons de lait ont été immédiatement acheminés vers le laboratoire de l'industrie laitière afin d'entamer les analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait destiné pour la mise au point du l'ben.

II.2. Analyse du lait de vache cru

II.2.1. Analyse physico-chimique

II.2.1.1. Détermination de la densité

La densité est déterminée à l'aide d'un lactodensimètre étalonné sur un lait maintenu au repos. Elle consiste à plonger l'appareil dans une éprouvette de 250 ml remplie de lait, lorsqu'il se stabilise, la lecture de la valeur de la densité se fait directement sur l'appareil.
La densité est mesurée à une température de 20°C. (**Larpent, 1997**).

II.2.1.2. Détermination de l'acidité Dornic

Le dosage est effectué par neutralisation de 10 ml de lait avec de la soude 1/9 N

en présence de phénolphtaléine (**Larpent, 1997**).

II.2.1.3. Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre, par immersion du bout de l'électrode dans le lait. La valeur du pH s'affiche immédiatement sur l'écran.

II.2.1.4. Matière grasse

Le dosage de la matière grasse est réalisée par la méthode acido-butyrométrique du type Gerber.

On introduit 10ml d'acide sulfurique, 11ml du lait et 1ml d'alcool iso-amylique dans un butyrométre. Le tous subit une centrifugation à 1200 tours /2 min

Le résultat est exprimé en g/l en appliquant la formule suivante :

MG (g/l)= (B – A) x 100

B : la lecture de la graduation à l'extrémité inferieure du butyromètre de la MG

A : la lecture de la graduation à l'extrémité supérieure du butyromètre de la MG

II.2.2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques permettent d'avoir une idée générale sur la qualité microbiologique du produit. Cette méthode consiste à faire des dilutions décimales à partir de la solution mère dans de l'eau physiologique.

II.2.2.1. Analyses effectuées

Le tableau XI représente les milieux de culture, types d'ensemencement, dilutions et conditions d'incubations pour le dénombrement et la recherche des micro-organismes dans le lait cru.

Tableau XI : Dénombrement ou recherche des germes dans le lait cru

Germe	**Milieux de culture**	**Dilutions**	**Type D'ensemencement**	**Températures et temps d'incubation**	**Références**
FTAM	PCA	10^{-5},10^{-6},10^{-7}	1 ml en masse	30°C/24h à 72h	**JORA n°70. (2004)**
Bactéries Lactique	MRS et M17	10^{-4},10^{-5},10^{-6}	1 ml en masse	30°C/24h à 48h	**JORA n°32. (2004)**
Levures et Moisissures	OGA	10^{-1},$10^{-2}10^{-30}$	1 ml en masse	30°C/3à4j	**JORA n°32. (2004)**
Coliformes Totaux et les fécaux	BCPL	10^{-2},10^{-3}, 10^{-4} 10^{-5},10^{-6}	En tube (2 tube de BCPL+cloche de Durham par dilution)	37°C/24h à48h	**JORA n°43. (2004)**
Staphylocoque	Chapman	10^{-2},10^{-3},10^{-4} 10^{-5}	1 ml en masse	37°C/24h à 48h	**JORA n°70. (2004)**
Salmonelles	SS+Additifs	Solution mère	1 ml en masse	37°C/24h à 48h	**JORA n°43. (2004)**

clostridium Sulfito-réducteur	VF+Additifs (Alun de fer et Sulfite de sodium)	Solution mère	1ml d'échantillon Dans un tube, subit un traitement Thermique à 80°C/10 minute, puis un refroidissement rapide (choc thermique), ensuite ajout de la gélose VF(en surfusion)	37°C/24h à 48h	**AFNOR. (2004)**

II.3. Le lait de vache pasteurisé

Le protocole d'analyse microbiologique et physico-chimique et le même que celui utilisé pour l'analyse du lait cru **(Tableau XI).**

II.4. La mise au point du l'ben artisanal

La mise au point du l'ben artisanal consiste à préparer trois type de l'ben :

- L'ben 1 est préparé avec la flore autochtone du lait (lait cru uniquement).
- L'ben 2 est préparé par l'ajout de la combinaison de bactéries lactiques sélectionnées (Lc1/Lb4/Lb7) à la flore autochtone du lait.
- L'ben 3 est préparé par l'ensemencement de la combinaison de bactéries lactiques sélectionnées au lait pasteurisé.

II.4.1. Les étapes de préparation de l'ben

Pour la mise au point des différentes préparations du l'ben. Les étapes suivantes ont été suivies :

- Préparation de 3 récipients de 500 ml de lait (2 récipients de lait cru et 1 récipient de lait pasteurisé).
- Ensemencement d'un flacon de lait cru et un flacon de lait pasteurisé à des taux de 10%(10^9UFC/ml) de pré-ferments de 48h préalablement préparée.
- Homogénéisation pendant 5 minutes.
- Incubation des 3 flacons à une température de 30°C dans l'étuve jusqu'au caillage du lait.
- Barattage manuelle à une température ambiante (20°C) pendant 20 minutes.
- Ajout d'un volume d'eau distillée stérile (5ml) afin de soustraire le beurre (écrémage).
- Conserver les différents l'ben au réfrigérateur à 6°C.

II.4.2. Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique du l'ben au cours de la conservation.

Un suivi de la qualité physico-chimique et microbiologique a été réalisé pour les trois types de l'ben conservés à une température de 6°C pendant dix jour.

La prise d'échantillons pour l'analyse est réalisée tous les trois jours.

L'analyse physico-chimique consiste à une mesure du pH et la mesure de l'acidité Dornic

Les analyses microbiologiques sont cites dans le **Tableau II :**

Tableau XII : Techniques de dénombrement sur milieux solides (JORA, 2004).

Type de microorganismes	**milieux**	**Dilutions**	**Techniques d'ensemencements**	**Conditions d'incubation**
Flore totale aérobie .mésophile	P.C.A	10^{-6},10^{-7} ,10^{-8} ,10^{-9} ,10^{-10}	1ml de dilution en masse	30°C/ 72h
Coliformes totaux	E.M.B	10^{-1},$10^{-2}10^{-3}$	1ml de dilution en masse	30°C/ 24h
Flore lactique	M17 et M.R.S	10^{-6},10^{-7} ,10^{-8} ,10^{-9} ,10^{-10}	1ml de dilution en masse	30°C/ 48h à 72h
Levures et moisissures	O.G.A	10^{-1},$10^{-2}10^{-3}$	1ml de dilution en masse	30°C/ 72h à 5 jours

Résultats et disscussions

1. La pureté des souches

Les résultats de la revivification des 18 souches de BL sont illustrés dans le **tableau XIII.**

Tableau XIII : Résultats de la revivification et purification des 18 souches lactiques.

Souches tests	*Lactobacillus*	*Leuconostoc*	*Lactococcus*	*Streptococcus*	*Pediococcus*
Aspect des colonies sur gélose MRS	Sur gélose, les colonies sont apparues de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre				
Repiquage sur bouillon MRS	En milieu liquide formation d'un trouble visible et dense après 18h d'incubation à 30°C et 37°C (selon la souche)				
Observation microscopique	Des bacilles Gram+ groupés en paires ou en chaines	Des coques Gram+ qui s'arrangent en paires ou en chaines	Diplocoques ou chaînettes Gram+	Des coques Gram+ groupés en paires ou en chaines	Des coques Gram+ isolés ou en paires formant des tétrades

Les dix-huit souches de BL étudiées se sont révélées toutes pures (Gram+ et catalase-). Ces souches sont retenues dans le but de sélectionner des souches les plus acidifiantes.

2. Standardisation des souches

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

Les résultats du dénombrement des 18 souches lactiques montrent qu'à partir de 6 colonies, incubées à 30°C /48h dans le lait écrémé stérile donne en moyenne une concentration de 10^9 UFC/ml pour toutes les souches. **(Tableau VIII, annexe I).** Ces résultats concordes avec les valeurs du dénombrement retrouvées par **Ouadghiri (2009).**

Les résultats de la standardisation des souches pathogènes montrent qu'à partir d'une colonie de *S.aureus* donne un *inoculum* $1{,}3\times10^9$ UFC/ml, une colonie d'*E.coli* donne un *inoculum* de 4.5×10^8 UFC/ml une colonie de *Proteus sp* et *En.cloacae* donnent des *inocula* de 10^9UFC/ml, et une colonie de *K. pneumoniae* donne un *inoculum* de 10^{10} UFC/ml. Effectivement, les souches ont une très bonne croissance sur les milieux utilisées (bouillon et gélose nutritive). **(tableau IX, annexe I).**

I. Le pouvoir acidifiant

I.1. Cinétique d'acidité des cultures pures

Afin d'étudier l'activité des souches de bactéries lactiques en cultures pures, l'évolution de l'acidité Dornic et du pH au cours de leur croissance dans le lait a été suivie toutes les 2h pendant 6h et après 24h et 48h.

Les résultats obtenus sont illustrés dans les **Figures 3, 4, 5 (tableaux II, annexe I)**

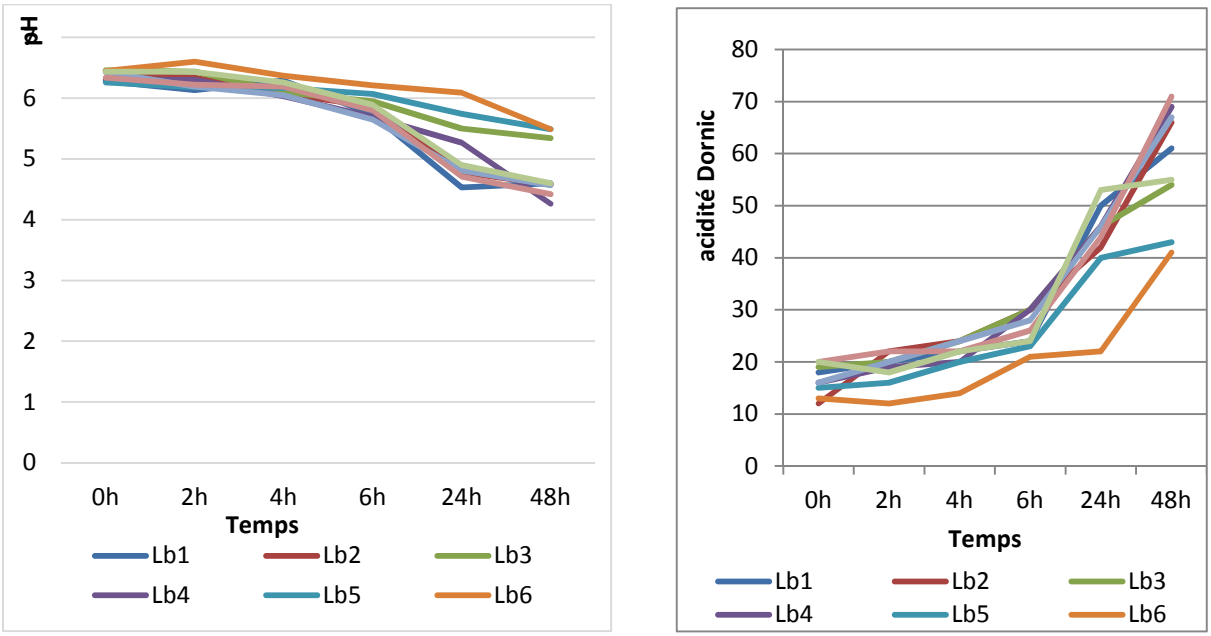

Figure 3 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic du lait ensemencé par les souches de *Lactobacillus*

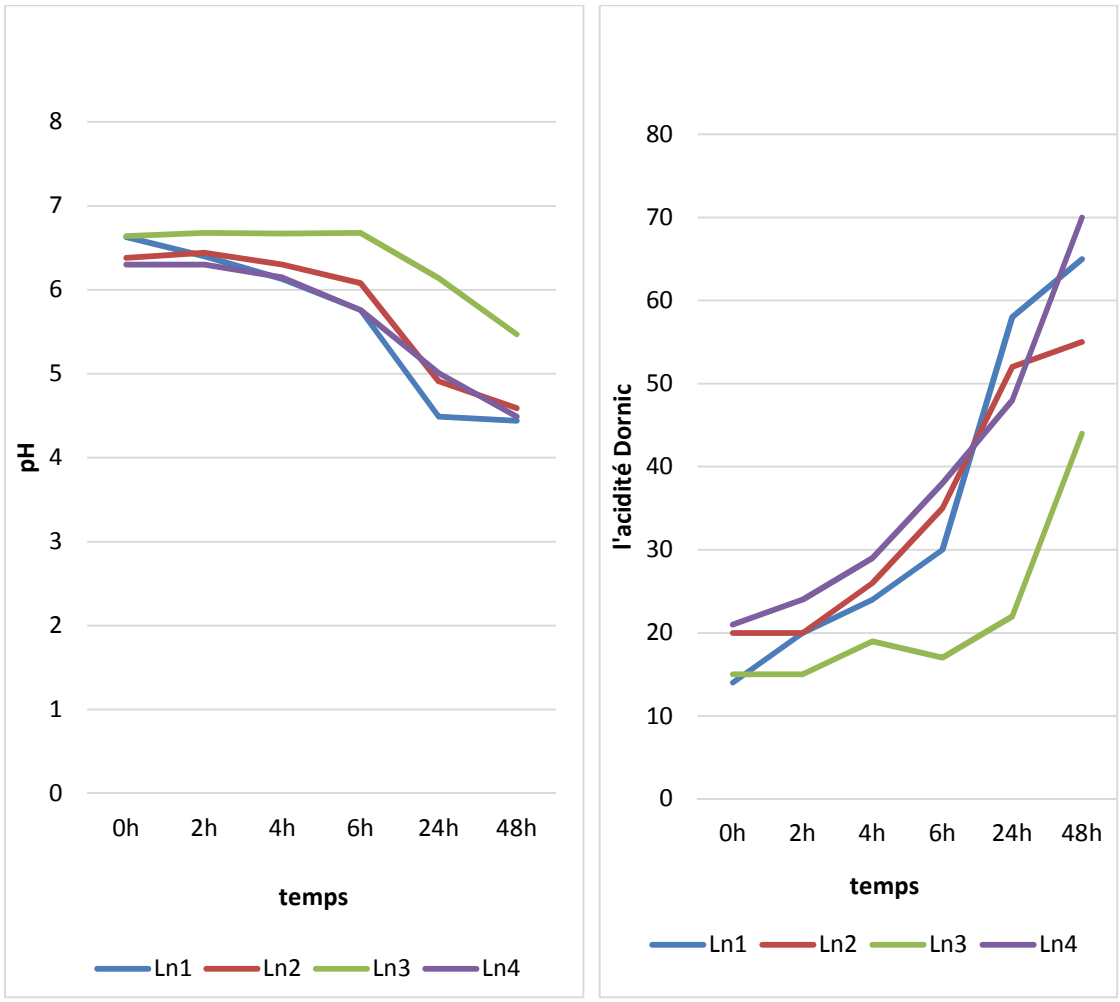

Figure 4 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic du lait ensemencé par les souches de *Leuconostoc*

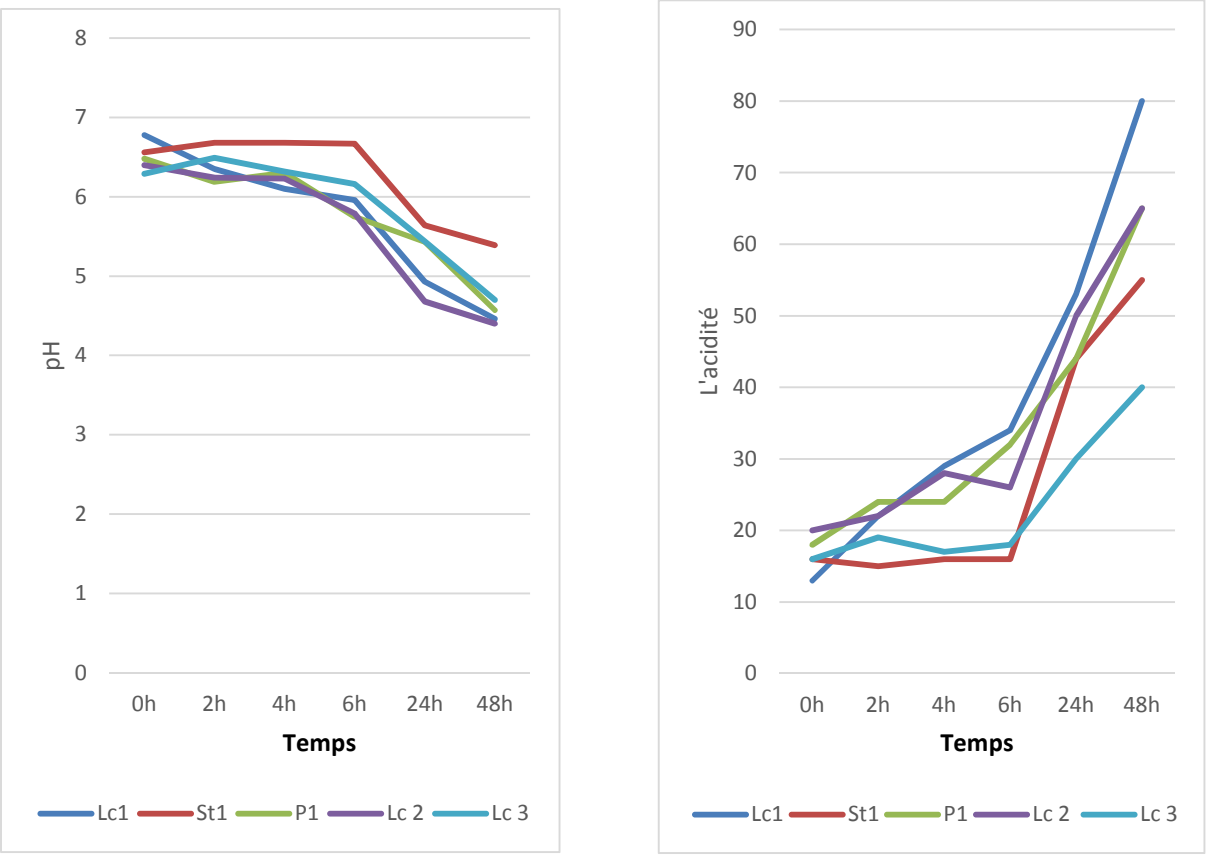

Figure 5 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic en fonction de temps du lait écrémé ensemencé par les cultures pures de *Lactococcus*, *Streptococcus* et de *Pediococcus.*

L'acidification est le résultat de l'accumulation du lactate dans le milieu suite à la dégradation de lactose ce qui induit à un abaissement important de pH et une augmentation de l'acidité titrable **(Chamba et *al*,. 1994).**

La baisse du pH du lait pendant les six premières heures **(tableau II, annexe I)** s'accompagne également d'une augmentation de production d'acides lactiques pour toutes les souches. Cette activité continue après 24 h et 48h.

La figure (3) **(tableau II et III, annexe I)** montre que les neuf souches des *Lactobacillus* étudiées montrent durant 48h d'incubation une diminution du pH accompagnée par une augmentation de l'acidité titrable et avec des variations des ΔpH élévées (**tableaux II et IV, annexe I**) au bout de 6h. les deux souches Lb4 et Lb7 sont les plus acidifiantes atteignant

respectivement des valeurs de [(pH 5,69 ;AT=30°D et ΔpH=0,61),(pH 5,65 ;AT=28 et ΔpH=0,78)]

Les résultats obtenus dans la figure (4) **(tableau II et III, annexe I)** montrent que la souche de Leuconostocs Ln1 est la plus acidifiante avec des valeurs de(pH 4,76 ;AT=30 et un ΔpH=0,88) au bout de 6h d'incubation à 30°C.

La figure (5) **(tableau II et IV, annexe I)** indique des valeurs d'acidification assez importantes pour les souches *Lactococcus, Streptococcus* et *Pediococcus*. En effet , après 6h d'incubation à 30°C on remarque que la souche Lc1 atteigne des valeurs de pH 5,96 ;AT=34°D et ΔpH=0,81.

Selon ces résultats, on peut supposer que les souches Lb4, Lb7 ,Ln1 et Lc1 ont montré des valeures d'acidifications les plus inportantes.

Selon **Cogan et *al*,. (1997)**, les bactéries lactiques acidifiantes sont celles qui sont capables de réduire le pH du lait de sa valeur initiale d'environ 6,6 à 5,3 sur une durée de 6 heures, En se basant sur ce critère, les souches Lb4 ; Lb7 ; Lc1 et Ln1 sont consedérées comme des bacteries à grand pouvoir acidifiant. Sur cette base , ces qutre souches sont sélectionnées pour l'étude de leur pouvoir acidifiant en culture mixte.

I.2. La cinétique d'acidification en cultures mixtes

Les résultats du pH et d'acidité Dornic suivi en cultures mixtes dans le lait pendant 48h d'incubation à 30 °C pour les souches sélectionnées Lb4 ; Lb7 ; Ln1+Lc1 sont résumés dans le **tableau V et VI (annexe I**) et illustrés sur les **figures 6 et 7**

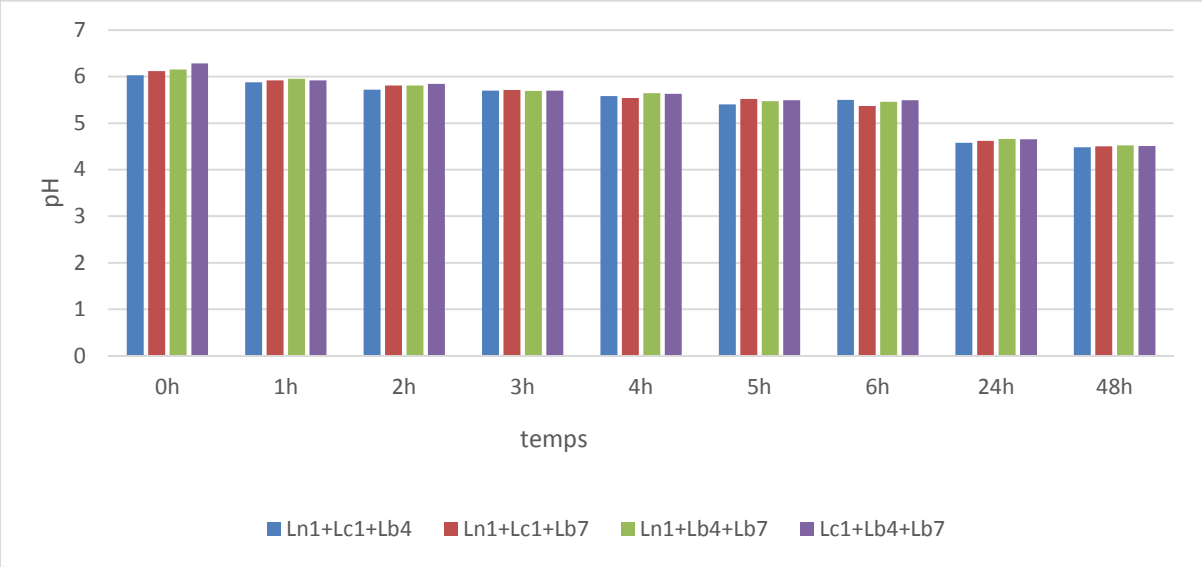

Figure 6 : Résultats du suivi de pH et de l'acidité Dornic des cultures mixtes des souches lactiques.

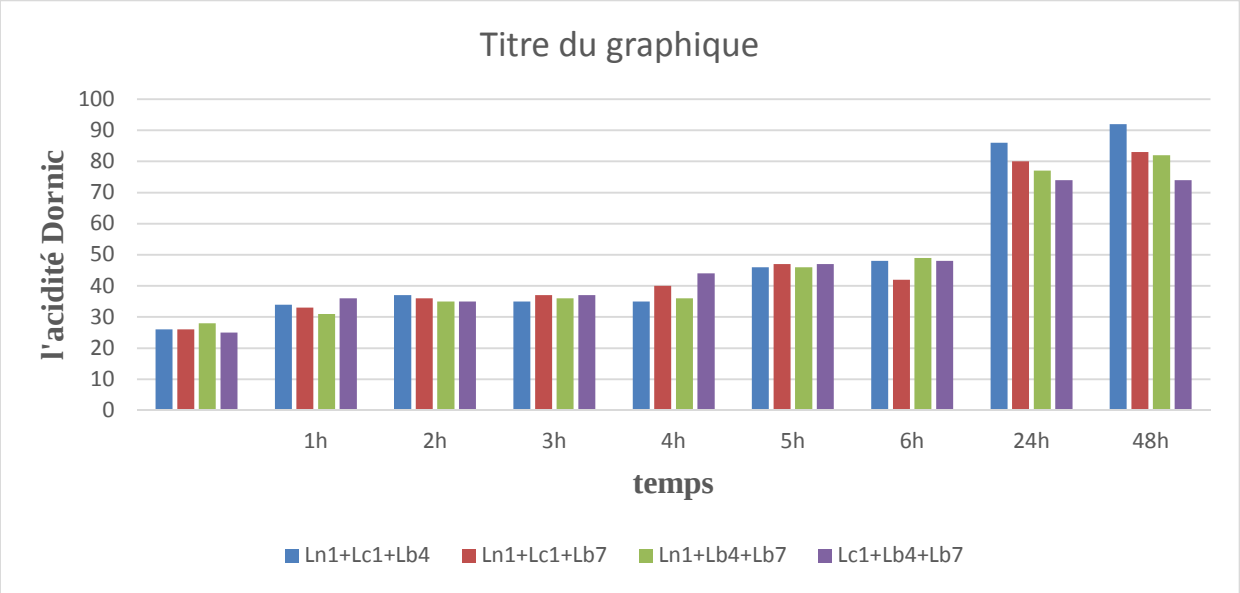

Figure 7 : Résultats du suivi de l'acidité Dornic des cultures mixtes des quatre souches lactiques

Les résultats obtenus montrent que les quatre associations présentent des valeurs de pH élevées en culture mixte que lorsqu'elles sont en culture pure.

L'activité acidifiante est plus importante pour la culture mixte où sont associées les souches, avec un ΔpH de 0,79 au bout de 6 heurs**. (tableau VII, annexe I).** Selon **Chamba et Prost (1989)** et **Chamba (1990)** ont confirmé qu'une souche de bactérie lactique n'est acidifiante que si la diminution de pH égale au moins 0,4 unité en 3H. En effet, selon ces travaux, la combinaison (Lc1+Lb4+Lb7) est classée comme étant à grand pouvoir acidifiant. Cependant la combinaison est retenue pour la mise au point du l'ben.

Les études des combinaisons des souches pour l'acidification nous ont permis de dégager une hypothèse de relation de coopération entre les souches de *Lactococcus* et de *Lactobacillus.* En effet, en présence de deux souches de *Lactobacillus,* la vitesse d'acidification du lait augmente de façon considérable.

L'association des souches de bactéries lactiques étudiées, en proportion identique, entraîne une amélioration du pouvoir acidifiant ; ceci indiquerait l'existence d'une interaction

entre les souches, une relation de symbiose qui se déroule en activant leur pouvoir fermentaire **(Ngounou et *al.*, 2003).**

Le pouvoir acidifiant des souches lactiques demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière. La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirées des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien **(Schmidt et *al.*, 1994)**.

II. Le pouvoir antibactérien des souches sélectionnées

II.1. Teste des spots

Selon les résultats mentionnés dans le **tableau XIV**, d'une manière générale, les souches testées ont montré des diamètres de zones d'inhibitions qui varient entre **6mm et 48mm** à l'égard *de S.aureus,* d'*E.coli* ATCC *2592* ; *Proteus sp, En.cloacae* et *K.pneumoniae*.

Les diamètres les plus importants sont notés par les souches du genre ***Lactobacillus* (Lb4 et Lb7)** avec des diamètres de **10mm à 38mm et 18mm à 48mm (Figure 8)**

Tableau XIV : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes (teste de spot).

Souches tests	**Souches cibles**	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**
Lc1	*S.aureus*	26
Ln		32
Lb7		20
Lb 4		18
Lc1	*E.coli*ATCC *25922*	8
Ln		18
Lb 7		36
Lb 4		14
Lc1		6

Ln	*Proteussp*	6
Lb 7		48
Lb 4		10
Lc1	*En.cloacae*	10
Ln		10
Lb 7		18
Lb 4		14
Lc1	*K.pneumoniae*	16
Ln		16
Lb 7		36
Lb 4		38

Les travaux de **Savadogo et *al.* (2004),** ont rapporté que les diamètres des zones d'inhibitions de bactéries lactiques isolées d'un lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de ***S. aureus*** et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'***E. coli.*** Cela montre que nos souches lactiques sont plus actives à l'égard de ***S. aureus*** avec des zones d'inhibitions de **(18 à 32 mm)** et d'***E. coli* (8 à 36 mm).**

Néanmoins, ces résultats coïncident (pour certaines souches) avec ceux obtenus par **Belyagoubi et Abdelouahid (2013),** où les diamètres de zones d'inhibitions de bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers traditionnels d'Algérie sont compris entre 6 et 36 mm vis-à-vis d'***E. coli***.

Les souches lactiques utilisées présentent une activité inhibitrice à l'égard de *Proteus ssp* d'un diamètre qui varie entre (**6 à 48mm).** La souche Lb7 présente la plus importante zone d'inhibition avec un diamètre de **48mm**.

Les zones d'inhibitions observées à l'égard d'*Enterobacter cloacae* varient de (**10 à 18mm).** Ces diamètres sont les moins importants obtenus dans la présente étude.

Les résultats de l'activité inhibitrice à l'égard de *klebsiella pneumoniae* (**16mm à 38mm)** se rapprochent avec ceux obtenus dans les travaux de **Labioui et *al.* (2005),** qui ont trouvés des zones d'inhibitions comprises entre (**20,5 et 25,7 mm)** lorsqu'ils ont sélectionné des souches de bactéries lactiques antibactériennes à l'égard de *klebsiella pneumoniae* prélevée des urines.

Cette activité inhibitrice exprimée par les souches de bactéries lactiques testées peut être due à la production d'acides organiques, H_2O_2 ou de bactériocines. En effet, selon **Hamed et Elattar (2013),** l'action inhibitrice des BL est due principalement à l'accumulation de principaux métabolites primaires tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le dioxyde de carbone. De plus, les BL sont également capables de produire des composés antimicrobiens tels que l'acide formique et l'acide benzoïque, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'acétoïne et les bactériocines.

III. La mise au point du l'ben

III.1. Analyse physico-chimique du lait

Les résultats des analyses physico-chimiques du lait cru de vache et du lait de vache pasteurisé réalisées au niveau du laboratoire d'analyse de la laiterie d'Amizour (GipLait) sont illustrés comme suite.

Tableau XV: Résultats d'analyses physico-chimiques du lait cru de vache.

Paramètre	Valeurs	Normes	Références
pH	6,70	6,6<pH<6,8	**(J.O.R.A, 1993)**
Acidité Dornic (°D)	17	15-18°D	**(J.O.R.A, 1993).**
Matière grasse (g/l)	34	28,5 à 32,5(g/l)	**(AFNOR ,2001),**
Densité	1,029	1,030 à 1,033	**(J.O.R.A, 1993)**

La valeur de pH du lait analysé **(tableau XV)** respecte les standards du pH du lait 6,6<pH<6,8 **(J.O.R.A, 1993),** et se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tels que **Ouadghiri (2009)** au Maroc avec un pH de 6,7

L'acidité du lait **(tableau XV)** 17°D respecte la norme de l'acidité du lait frais fixée entre 15-18°D **(J.O.R.A, 1993).** Cette dernière s'explique par le fait que l'éleveur et le collecteur ont bien conservés le lait après la traite.

D'après les résultats obtenus, on constate que la teneur en matière grasse du lait cru est de 34 g/l ce qui n'est pas conforme (valeurs plus élevées) aux normes (28,5 à 32,5) avancés par l'**AFNOR (2001).** Néanmoins, ces valeurs se rapprochent des résultats de **Vignola en 2002** qui a trouvé des valeurs de 24 à 37 g/l. La variabilité de la teneur en matière grasse dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques, le stade de lactation, l'alimentation et le rang de la traite (**Kamoun, 1994).**

La densité du lait mesurée à 20°C est de 1,029, cette valeur se rapproche de celle décrite par **(Bourgeois et *al.*, 1990).** La densité dépend de la teneur en matière sèche, en matière grasse et des disponibilités alimentaires.

En résumé, les résultats de l'analyse physico-chimique du lait montrent que ce dernier est de bonne qualité physico-chimique.

III.2. Analyse microbiologique du lait

Les résultats de l'analyse microbiologique du lait de vache sont représentés dans la figure 9 **(tableau X, annexe I).**

III.2.1. La flore totale aérobie mésophile

La flore totale mésophile aérobie (figure10) présente une charge de $2{,}6.10^{8}$UFC/ml. Selon le **J.O.R.A(1998),** ce taux dépasse la norme (10^{5}UFC/ml).

Ces résultats peuvent être dus à la richesse du lait cru en flore lactique, qui est une flore d'intérêt.

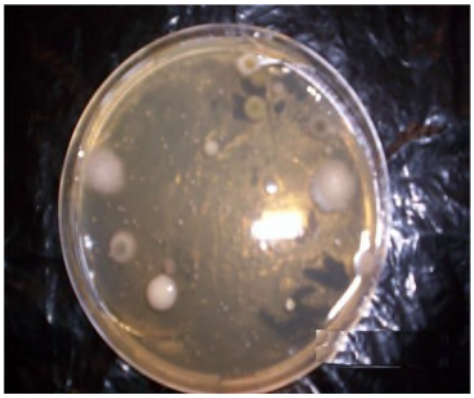

Figure 10. Dénombrement de la flore mésophile totale sur le milieu P.C.A à 30°C.

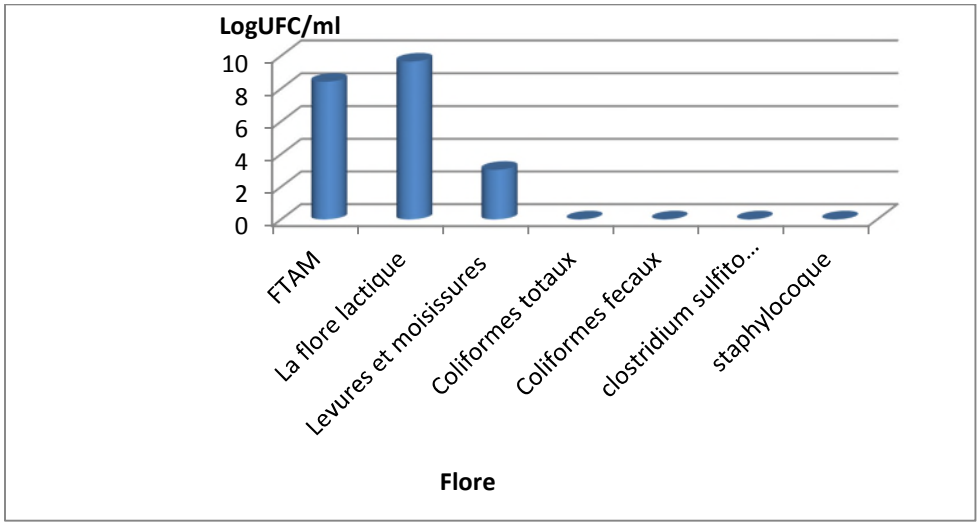

Figure 9 : Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache.

III.2.2. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sur MRS et M17 présentent une charge de $9{,}1.10^{6}$UFC/ml. Ces résultats sont similaires aux résultats rapportés par **Ouadghiri (2009)** qui a trouvé des valeurs qui varient de 8,2 x 10^{3} UFC/ml à 2,1 x 10^{7} UFC/ml.

Les résultats obtenus montrent la richesse de ce lait en bactéries lactiques

III.2.3. Levures et Moisissures

Les résultats des analyses microbiologiques obtenus **(figure 11),** révèlent la présence des levures et moisissures à des valeurs de $1{,}1.10^{3}$UFC/ml qui sont inferieurs à celles trouvées par **Bonfoh et *al.* (2002)** au Mali (moyenne de $3{,}4.10^{4}$UFC/ml pour 157 prélèvements). Cependant les résultats trouvés par **Tantaoui-Elaraki et *al.*(1983)** au Maroc pour 20 échantillons, ne révèlent aucune présence de moisissures.

Leur présence dans le lait peut être due à une contamination extérieure (murs, sol, air et insectes).

III.2.4. Les Coliformes totaux et fécaux

Les résultats d'analyses ont révélé une absence de contamination par des coliformes totaux et donc une absence des coliformes fécaux dans le lait, ce qui est conforme à la réglementation algérienne **(J.O.R.A, 1998).** Cela peut être du au bonnes pratiques d'hygiène au moment de la traite.

III.2.5. Les Streptocoques totaux et fécaux

Nos résultats indiquent une absence des Streptocoques totaux et fécaux dans le lait analysé, ce qui rend nos résultats conformes à la norme **(J.O.R.A, 1998).** Cela peut être dû au nettoyage du sol des fèces avant la traite.

III.2.6. Salmonelles

Le résultat obtenu de la recherche de ce groupe pathogène n'a pas montré de contamination du lait cru analysé, ce qui est conforme à la réglementation algérienne **(J.O.R.A, 1998).** La principale source de contamination serait l'excrétion fécale des salmonelles, dissémination de la bactérie dans l'environnement, puis contamination de la peau des mamelles et du matériel de traite et enfin passage dans le lait **(Guy,2006).**

III.2.7. Staphylocoques

Nos résultats montrent une absence totale de staphylocoques donc aussi du *Staphylococcus aureus* dans le lait ce qui est conforme à la norme **(J.O.R.A, 1998).**

Les infections mammaires à staphylocoques représentent la principale source de contamination du lait à la production, d'autres sources de contamination sont également à considérées tels que les mains des trayeurs **(Thieulon, 2005).**

III.2.8. Clostridiums sulffito-réducteurs

Les Clostridiums sulfito-réducteurs sont absents dans le lait, ce qui est conformes à la norme algérienne **(J.O.R.A, 1998).** Cela, est dû peut être au nettoyage du sol avant la traite et en générale aux bonnes conditions d'hygiène.

II.3. La préparation du l'ben

II.3.1. Le temps de maturation

Les différents temps de maturation pour les trois types de l'ben sont illustrés dans le **tableau XVI**

Les différents temps de maturation des trois types de l'ben sont illustrés dans le (tableau XV).

Tableau XVI : Temps de maturation de l'ben pour atteindre le caillage.

Echantillon	Temps de maturation
L'ben1 (lait cru)	24h
L'ben 2 (lait cru+ferments)	18h
L'ben 3 (lait pasteurisé +ferments)	16h

Les temps de la maturation des trois types du l'ben différent ; 24h pour l'ben1, 20h pour l'ben2 et 15h pour le l'ben3 ; le l'ben1 présente le temps de maturation le plus important (24h). Les l'ben1 et l'ben2 ont des temps de maturation moins élevé. En effet, cela peut être du à flore qui constitue les différents l'ben. Effectivement, les l'ben2 et l'ben3 sont ensemencés par la combinaison des souches de bactéries lactiques sélectionnées comme étant la plus acidifiante. L'utilisation de souches douées d'un grand pouvoir acidifiant à permet de réduire le temps de maturation du l'ben (**figure 4)**

II.3.2. Le suivi physico-chimique

Les résultats de suivi du pH et de l'acidité Dornic juste après l'élaboration du l'ben pendant 10 jours pour les trois types de l'ben sont représentés dans le **(tableau XII)**

Tableau XVII : Résultats d'analyse physico-chimique du L'ben

	L'ben 1		L'ben2		L'ben3	
Jours / Valeurs	**pH**	Acidité Dornic(°D)	pH	Acidité Dornic(°D)	pH	Acidité Dornic(°D)
Jour 1	**4,6**	**100**	**4,63**	**120**	**4,74**	**126**
Jour 4	**4,56**	**110**	**4,52**	**110**	**4,46**	**134**
Jour 7	**4,55**	**105**	**4,52**	**115**	**4,37**	**145**
Jour 10	**4,58**	**86**	**4,49**	**125**	**4,31**	**129**

Le suivi de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic au cours de la conservation à 6°C (J 1 ; J4 :J7 ; J10) pour le L'ben1 (**tableau XVII)** a monté que ce paramètre varie entre (4,55 et 4,6) avec des valeurs d'acidité Dornic qui varient entre (86 et 110°D) au 10 ^{eme} jour.

On remarque une légère diminution de pH entre le premier jour et le 10eme jour**.** En effet, l'acidité Dornic du l'ben1 enregistre des valeurs comprises entre (110) et (86°D) dont la valeur la plus élevée (110°D) est enregistrée au bout du 4^{emme} jour. Cependant, la valeur la plus faible (86°D) est enregistrée dans le 10eme jour.

Les valeurs du pH et d'acidité Dornic obtenus durant la conservation pour le l'ben 2 (**tableau XVII)** sont respectivement comprises entre (4,49 et 4,63) et (110 à 125°D),

Les résultats obtenus pour le l'ben3 (**tableau XVII)** indiquent des valeurs de pH entre 4,31 et 4,74 et des valeurs d'acidité qui varie de 126 et 145°D.

Toute fois cette variation de pH pour le L'ben1 et le L'ben2 entre dans l'intervalle d'acceptabilité de la norme algérienne qui tolère des valeurs de pH 4,4 à 4,60 **(J.O.R.A, 1993).**

Les valeurs de pH obtenus pour le L'ben3 (4,31 à 4,75) sont similaires à ceux de **Deing, (2001**), qui a trouvé des valeurs de pH allant de 3,96 à 4,9. Néanmoins, pour 92% d'échantillons le pH est inferieur à 3,96. Ces valeurs de pH relativement basses peuvent s'expliquer par la production d'acides par fermentation.

On note une forte augmentation de l'acidité Dornic du l'ben par rapport à celle du lait cru, ce qui témoigne d'une fermentation lactique importante dans ce produit **(Marnissi et *al*., 2013)**. Néanmoins, nos résultats d'acidité Dornic sont supérieurs à la norme algérienne **(J.O.R.A, 1993)** qui tolère entre 75 et 85°D.

Cependant une diminution de l'acidité Dornic pour les trois type de L'ben au bout de 10^{eme} jour a été notée. Il faut cependant noter que les valeurs basses de pH ne vont pas de paire avec le niveau d'acidité Dornic élevé. Effectivement, selon **Tourette et *al.*, (2001)** il n'y a pas de relation d'équivalence réelle entre le pH et l'acidité Dornic.

Les variations de pH et d'acidité Dornic au cours de la conservation s'expliquent par la fermentation lactique assurée par les bactéries lactiques présentes dans le L'ben. En effet, le maintien du L'ben au froid empêche la multiplication bactérienne, mais il n'arrête pas complètement leur activité métabolique.

La composition chimique du « L'ben » est variable, elle dépend des localités, des régions, des fermes, de la composition chimique du lait cru de départ et de la procédure de fabrication **(El Baradei et *al*., 2008).**

III.3.3. Le suivi microbiologique

Les résultats du suivi microbiologique de l'ben au cours de sa conservation à une température de 6°C sont illustrés dans les **figures 11, 12, 13 (tableaux XI .XII et XIII, annexe I).**

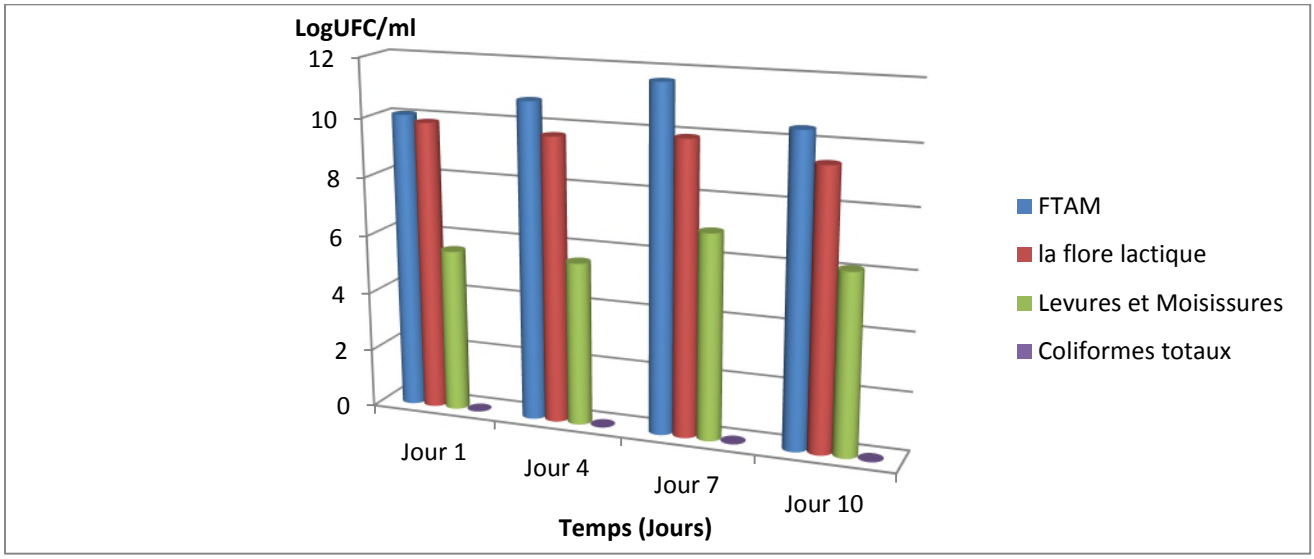

Figure 11 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben1 en fonction du temps.

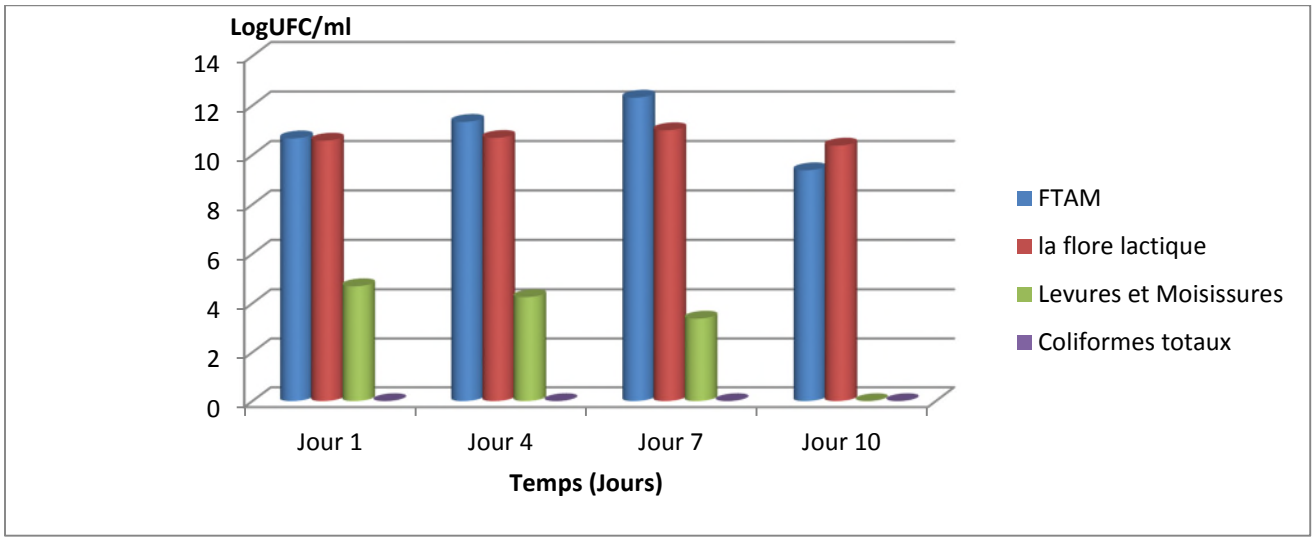

Figure 12 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben2 en fonction du temps

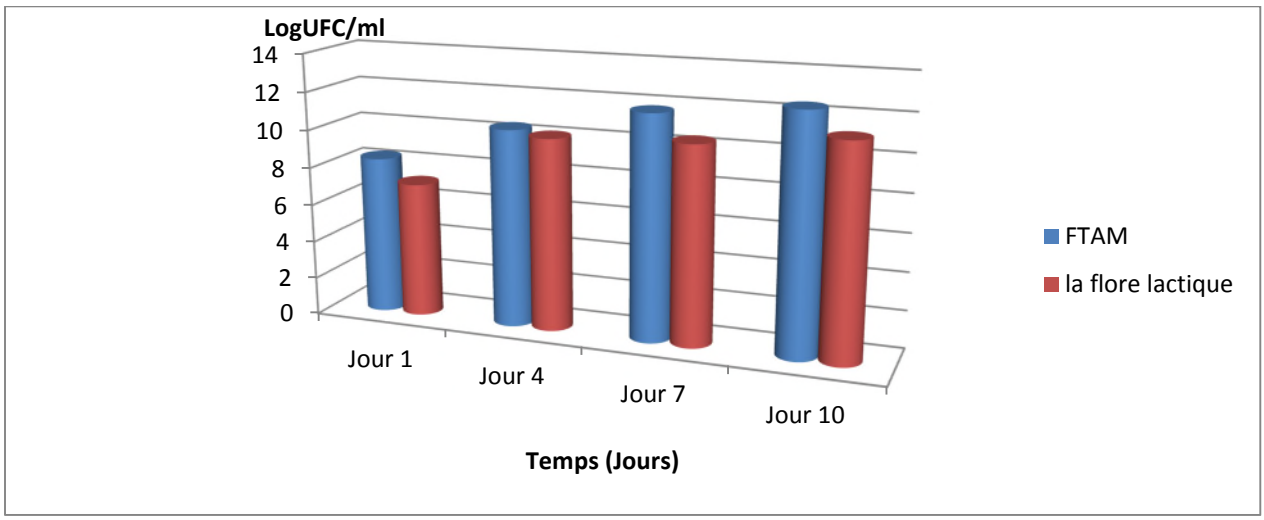

Figure 13 : Résultats de l'analyse microbiologique du L'ben3 en fonction du temps

III.3.3.1. La flore totale aérobie mésophile

Le nombre de la flore totale aérobie mésophile du L'ben1 est de $1{,}2.10^{10}$ UFC/ml au premier jour, elle atteint la valeur maximale ($4{,}4.10^{11}$UFC/ml) le septième jour. Cependant, une diminution de la flore totale est notée le dixième jour pour atteindre un nombre de $2{,}7.10^{10}$UFC/ml.

Le nombre de la flore totale du L'ben2 est $4{,}7.10^{10}$UFC/ml le premier jour puis elle se stabilise jusqu'au septième jour où elle augmente pour atteindre 10^{12}UFC/ml. Néanmoins, elle diminue considérablement le dixième jour pour atteindre un taux de $2{,}4.10^{9}$ UFC/ml.

Les résultats obtenus pour le suivi de la flore totale de L'ben3 sont de $2{,}3.10^{8}$ UFC/ml le jour de l'élaboration du L'ben3. On a constaté une évolution de la flore totale durant les dix jours d'étude par des nombres de $2{,}8.10^{10}$ UFC/ml le jour4, 7, 7.10^{11} UFC/ml le jour7 et contrairement au L'ben1 et L'ben2 on observe une augmentation de la flore totale $2{,}9.10^{12}$ UFC/ml le dixième jour. Cette diminution est probablement due à la présence des souches Lb4, Lb7 et Lc1 douées d'un effet antibactérien.

D'après les figures 1, 2, et 3 on constate une diminution de la flore totale du L'ben1 et L'ben2 au bout du dixième jour, contrairement à la flore totale du L'ben 3 où elle continue d'augmenter.

Nos résultats sont supérieurs aux résultats rapportés par **Tantaoui- Elaraki et *al* (1983)** au Maroc pour une moyenne de $2{,}5.10^{9}$UFC/ml pour 20 échantillons.

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile reste une très bonne méthode permettant de garantir la sécurité alimentaire des aliments dans le contrôle industrielle. Un aliment dont la flore totale est trop élevée montrera de mauvaises conditions de conservation est sera considéré comme impropre à la consommation même en absence d'une flore pathogènes **(Verne-bourdais et *al*., 2002).**

III.3.3.2. La flore lactique

Le dénombrement de la flore lactique sur MRS et M17 du L'ben1 a donné des valeurs de $7{,}2.10^{9}$ UFC/ml le premier jour et on constate une légère diminution au cours des dix jours de conservation pour atteindre une valeur de $2{,}5.10^{9}$ UFC/ml.

D'après les résultats obtenus du suivi du L'ben 2 au cours de sa conservation, un nombre de $3{,}25.10^{10}$ UFC/ml est obtenus, le premier jour de sa préparation, ce taux reste stable (5.10^{10}

UFC/ml) le quatrième jour. Une augmentation est notée le septième jour pour atteindre 10^{12} UFC/ml. La flore lactique du L'ben1 diminue au bout du dixième jour où un taux de $2{,}4.10^{9}$ UFC/ml, est obtenu.

Une valeur de $1{,}4.10^{7}$ UFC/ml de flore lactique est néanmoins, notée pour le L'ben3 le premier jour. Cette valeur augmente pour atteindre $1{,}4.10^{10}$ et $2{,}7.10^{10}$ UFC/ml le quatrième et le septième jour respectivement. Cependant, et contrairement au deux premiers L'ben une augmentation des taux de la flore lactique ($1{,}5.10^{11}$ UFC/ml) est notée le dixième jour.

En effet, la flore lactique du L'ben1 et du L'ben2 diminue au cours de leurs conservation.

Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Marnissi et *al*. (2013)** qui ont trouvé une moyenne de bactéries lactiques de 5.10^{5}UFC/ml pour 96 échantillons de l'ben.

III.3.3.3. Levures et moisissures

Le suivi des levures et moisissures est réalisé pour le L'ben1 et L'ben2 seulement car le lait utilisé pour la mise au point du L'ben3 est stérile.

On a enregistré pour le L'ben1 une valeur de $3{,}6.10^{5}$ UFC/ml, elle reste stable le quatrième jour par un taux de $3{,}7.10^{5}$UFC/ml. Cependant, au bout du septième jour cette flore augmente à 10^{6}UFC/ml qui reste stable le dixième jour. Cela peut s'expliquer par le pH optimal de croissance compris entre 4,4 et 6,5, qui correspond à l'acidité du L'ben **(Marinissi et *al.*, 2013**

Néanmoins, les résultats d'énumération des levures et moisissures pour le l'ben2 additionné de souches de bactéries lactiques de la combinaison la plus acidifiante indiquent une valeur de 5.10^{4}UFC/ml le premier jour qui reste stable jusqu'au 4^{eme} jour. Une diminution du taux de cette flore a été notée au septième jour ($2{,}4.10^{3}$ UFC/ml) et continue de diminuer pour atteindre $3{,}21.10^{2}$UFC/ml le dixième jour. Cette diminution peut s'expliquer par l'activité antifongique des ferments lactiques (*Lb.*7 et 4, *Lc*1) utilisés dans la mise au point du L'ben.

En effet, le lait de vache et de chèvre sont des réservoirs de lactobacilles à caractère antifongique. Cependant, certains chercheurs ont trouvé que la majorité des bactéries lactiques qui sont à caractère antifongique ne sont pas des lactobacilles, par exemple environ 60 % de la flore lactique de la grenade présentent une activité antifongique dont 82 % sont des coques **(Gajbhiye et *al*., 2012).**

Le genre *Lactobacillus* est le plus retrouvé parmi les bactéries lactiques à caractère antifongique, suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* ainsi que des genres *Pediococcus, Enterococcus* et *Weissella*. Les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins retrouvés **(Shekh et *al*., 2009 ; Valerio et *al*., 2009 ; Dalié et *al.*, 2010a ; Nakata et *al.*, 2010 ; Ndagano et *al.*, 2011 ; Baek et *al.*, 2012).**

III.3.3.4. Les coliformes totaux

Le suivi des coliformes totaux dans les échantillons du L'ben a révélé l'absence totale de ces germes. L'absence des entérocoques peut être liée à la présence de souches productrices de bactériocine **(Benkerroum et *al*., 2000)** bien que cette caractéristique n'a pas été vérifiée dans cette étude. Cela peut s'expliquer par les bonnes pratiques d'hygiène pendant la traite.

Conclusion

Les 18 souches utilisées dans cette étude ont été isolées de l'ben traditionnel. L'étude de leur pouvoir acidifiant en culture pure est réalisée dans le but de sélectionner les souches les plus acidifiantes dont le pouvoir acidifiant sera aussi étudié en culture mixte en vue de leur application dans la mise au point d'un L'ben artisanal.

Le suivie de la cinétique d'acidification en culture pure des18 souches lactiques a montré que les souches Lb4, Lb7, Lc1 et Ln1 ont un pouvoir acidifiant important dans les premières heures d'incubation dans le lait écrémé stérile, classant ces dernières parmi les bactéries à grande activité acidifiante (ΔpH 0,61; 0,68; 0,8; 0,87 après 6h d'incubation). Les Quatre souches ont été sélectionnées pour les étudier en culture mixte. Quatre combinaisons ont été étudiées (Ln1+Lc1+Lb4; Ln1+Lc1+Lb7; Ln1+Lb4+Lb7; Lc1+Lb4+Lb7). Les résultats obtenus ont montré que les souches de bactéries lactiques sélectionnées acidifient mieux en association. En effet, la combinaison la plus acidifiante était Lc1+Lb4+Lb7 avec un pH de 5,49 et une acidité de 42 °D après 6heures d'incubation et d'un pH de 4,62 et une acidité de 80°D après 24h d'incubation. En effet, cette combinaison est sélectionnée pour la mise au point de trois préparations de l'ben artisanal (l'ben2 :Flore autochtone du lait cru+ferments, l'ben3 :lait de vache pasteurisé+ferments et le l'ben1 a été réalisé par le lait cru : flore autochtone du lait seulement(consédéré comme témoin).

Les résultats du suivie de la qualité microbiologique de ces derniers pendant la conservation à+6°C ont montrés que le l'ben additionné des souches lactiques sélectionnées présente une meilleur qualité microbiologique avec une diminution importante des taux de levures et de la flore totale. En effet, les résultats obtenus pour l'étude de l'activité antibactérienne par le test de spot à l'égard de *S.aureus, E.coli* ATCC 25922, *Proteus sp, En.cloacae, K. pneumoniae*ont ont montré que toutes les souches testées sont douées d'activité antibactérienne vis à vis de l'ensemble des pathogènes testés avec des zones d'inhibitions allant jusqu'au 48mm. Une réduction importante (de 6 heures) du temps de maturation est observée pour les l'ben additionnés des souches lactiques, ce qui est du au pouvoir acidifiant de ces dernières.

Ces résultats suggèrent, l'utilisation de ces souches lactiques (Lc1, Lb4 et Lb7) non seulement comme agents acidifiants mais aussi comme bioconservateurs dans la mise au point de produits laitiers fermentés.

Néanmoins, cette étude reste préliminaire et nécéssite des travaux complémentaires concernant :

- L’étude d’autres proprietées technologiques (activités proteolytiques, l’activité aromatisante , texturantes …).
- Réaliser d’autres essais afin de confirmer les résultats obtenus.
- Réaliser une analyse sonsorielle pour connaitre les differents taux d’appréciation des trois L’ben élaborés au cours de cette étude.
- Essayer d’autres combinaisons
- Réaliser un suivi microbiologique et physico-chimique au dela des dix jours.
- L’application des souches séléctionnées dans d’autre types de laits fermentés.

Références bibliographiques

1. **Afnor**. (2001). Lait-Détermination de la teneur en matiére grasse-Méthode gravimétrique(méthode deréférence). 21p.
2. **Afssa.** (2005)**.** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme.

3. **Ai, L., Zhang, H., Guo, B., Chen, W., Wu, Z., Wu, Y**. (2008). Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *lactobacillus casei*lc2w. carbohydrate polymers, **74** : 353-357.

4. **Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., Isabelle Chevallier, I**. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *food microbiology,* **22** : 373-382.

5. **Badis, A., Guetarnib, D., Moussa Boudjemaa, B., Hennic, D.E., Kihalc, M**. (2004). Identification and technological properties oflactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology,* **21**:579–588.

6. **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R.** (2005).Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile). *In0 scien.tech.* **23** : 30-37.
7. **Baek E, Kim H, Choi H, Yoon S, Kim J.** (2012). Antifungal Activity of Leuconostoccitreum and Weissellaconfusa in Rice Cakes, Journal of Microbiology, **50**: 842-848

8. **Belyagoubi, L. and Abdelouahid, D.E.** (2013). Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. Advances in Food Sciences. **35 (1)** :84- 85.

9. **Benkerroum, N.,Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S. and Filali-Maltouf, A.** (2000). Isolation of a bacteriocin-producing Lactococcuslactis subsp. lactis and application to control Listeria monocytogenes in Moroccan jben. J . Appl. Microbiol. **89**: 960– 968.

10. **Benkerroum, N., Tammime A.Y.** (2004). Technology transfert of some traditional products (Lben, Jben and smen) to small industrial scale. Food Microbiology (21).

11. **Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., and Webb, C**. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* **36**: 527–543.

12. **Bonfoh, B., Fané, A., Traoré, NA., Coulibaly, Z., Simbé, C-F, Alfaroukh,OI., Nicolet, J., Farah, A et Zinsstag J.** (2002). Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le district de Bamako au MALI. Revue International. Science de la Vie et de la Terre. N spécial Actes du colloque international. 840 p.

13. **Bottazzi, V., Mercenier, A.** (1994). Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques.Dans : Bactéries lactiques. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Lorica-Uriage, **2** : 409-418.

14. **Bourgeois, C., Mescle,J.,et Fet Zucam**. (1990). Microbiologie Alimentation ; aspect microbiologique de la sécurité et la qualité alimentaire. Edition : Lavoisier Techniques et Documentaion. Paris. 422p.

15. **Bourgeois, C.M et Leveau, JY.** (1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires : contrôle microbiologique ; 3, Ed Technique et Documentation 523 p. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: de Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Lorica, Uriage, pp. 25-116.

16. Bouton, Y et Grappin, R. (1995)**.** Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. Le Lait, Volume 75, Number I, 31-44.

17. **Chamba J. F**. (1990). Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles. Revue laitière française, **492** : 47-50.

18. **Chamba, J.F et Prost, F**. (1989). Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication de fromage à pâtes cuites. Lait, **69** : 417-431.

19. **Chamba, J. F., Duong. C, Fazel. A et Prost. F**. (1994). Sélection des bactéries lactiques. InBactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques .(H. Deroisart,& E. M. Luquet, éd..), Technique & Documentation, Lorica, Paris, **01**: 499-518.

20. **Chye, F.Y., Abdullah, A. and Ayob, M.K.** (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol,* **21**: 535–541.

21. **Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi- Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Reac, M.C. and Rodriguez, E.** (1997)**.** Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res. **64**: 409–421.

22. **Coulon, J.B., Pradel, P. and Verdier, I**. (1995). Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk. *Lait*, **75**: 513–521.

23. **Dalié, D.K.D, Deschamps, A.M, Atanasova-Penichon V.**(2010a). Potential of Pediococcuspentosaceus (L006) Isolated from Maize Leaf To Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth, Journal of Food Protection**, 73**, 1129-1137.

24. **De Roissart, H. et Luquet, F.M**. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. **1**. pp. 1-286.

25. **De Vuyst L. *et al.*** (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*strains as functional startrter culture in the fermented milks. International Dairy Journal. **13**, 707-717.

26. **Dellaglio, H., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., et Janssens, D**. (1994). Caractiristiquegénerales des bacteries lactique. Dans défirent bacteries lactique. H De Roissard et F.M. Luquet (ed).lorica,Uriage.vol**1** :25-116.

27. **Dieng M.** (2001). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur les marchés dakarois. Thése de doctorat : Médecine Vétérinaire,Dakar,150 p.

28. **Dillon, J.C**. (2008). Place du lait dans l'‟alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G (Agro Paris Tech).

29. **Dortu, C., Thonart, P**. (2009). les bactériocines des bactéries lactique : caractéristique et intérités pour la bioconservation des produits alimentaire. Biotechnol. Agran. Soc. Environ **13 :** 143-154.

30. **Drouault, S. et Corthier, G**. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés.

31. **El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J.C**. (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* **121:** 295–301.

32. **FAO/OMS** (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (OrganisationMondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report. Cordoba, Argentina.

33. **FAO/WHO**.(2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp.1-11.

34. **Fleming, HP., Herchells, JL et Caslilow, EN.** (1975). Microbiol inhibition on isolate Pedioccus from cucumber bune. AppliedEnvironmentalMicrobiology. **30**, 1040-1042.

35. **Fox, A-T. and Thomson, M**. (2007). Adverse reactions to cow‘s milk. *Paediatr. Child Health*. **17(7):** 288–294.

36. **Gajbhiye M, Prakash D, Jagdale S, Ahiwale S, Patil N, Kapadnis B., 2012**, Pomegranate Borne Fungicidal Lactic Acid Bacteria and their Biodiversity, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, **82**, 413-419.

37. **Gorbach S.L.,** (1996). The Discovery of lactobacillus GG. Nutrition to day**. 31** (6) 2S-4S.

38. **Guiraud JP** (1998). Techniques d’analyse microbiologique. In: « Microbiologie alimentaire ». Dunod éd., Paris. France. pp. 171-246.

39. **Guy FI.** (2006). Elaboration d’nu guide méthodologique d’intervention lors de contaminations par les salmonelles de produits laitiers au lait cru en zone de productions fromagéres AOC du massif central. Thése de Doctorat d’état, université Paul-Sabatier de Tolouse, France, 17p.

40. **Hamed, E et Elattar, A.** (2013). Identification and some probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Egyptian Camels Milk. J Life Science. **10**Supp 1: 1952-1961.

41. **Heyman, M., Heuvelin, E**. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20** : 85–9.

42. **Holzapfel W. H.; Haberber P.; Geisen R.; Bjôrkroth J. et Schillinger U**. (2001). Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. **73(**Supll) : 365 S-73S.

43. **JORA .** (1993). Arrêté interministériel 18 aout 1993 relation spécifications et à la présentation de certain lait de consommation. Pp 16-20.

44. JORA : n° 32 du 23 mai (2004). Arrêté du 27 mars mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrent des organismes microbiens pour le lait fermenté.

45. JORA : n° 42 du 15 juin (2005). Arrêté 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des Salmonella dans le lait et les produit laitiers**.**

46. JORA : n° 43 du 4 juin (2004). Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode dénombrent des coliformes dans les laits fermentés**.**

47. JORA : n° 70 du 7 novembre 2004. Arrêté 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour l'essai et les dilutios en vue de l'examen micrbiologique.

48. **JORA**. (1998). Arrêté sur interministériel 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté de23 jullet 1994 relatif au spécifications microbiologique se certains denrées alimentaires. Pp 7-25.

49. **Kalit S., Lukac H., Vranek J., Kaps M., Perko B et Cubric, V.** (2005)**.** Proteolysis and the optimal repning time of tounj cheese. International dairy journal n° 15. Ed ELSEVIER, Pp. 619 à 624.

50. **Kamoun M**. (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. In Tisserand J-L. (ed) Elevage alimentaire du dromadaire :camel production and nutrition. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, p. 81-103.

51. **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M.** (2005). Séléction de souches de bactéries lactiques antibactériennes .Bull Soc. Pharm. Bordeaux., **44** :237-250.

52. **Larpent, J.P.** (1991). Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition : LAVOISIER, Paris.

53. **Larpent J.P.**(1997).Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 1073P.

54. **Larpent, J.P**. (1997). Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages.

55. **Laurent, S**. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris*. 307 pages.

56. **Leveau, J-Y. and Bouix, M**. (1993). Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Tec et Doc Lavoisier, Paris, France.

57. **Marnissi, B.,Belkhou, R., El Oualilalami, A., Bennani, L. (**2013). Caractérisation microbiologique et physicochimique du lait cru et de dérivés traditionnels Marocains (l ben et j ben). Les technologiques de laboratoire, **8**(**33**). 100-111.

58. **Marty, D. S. and Kummar, K. A.** (1995). Traditional uses of sorghum and millets. In D. A. V. Dendy (Ed.), Sorghum and Millet: Chemistry and Technology. St. Paul Minnesota: AACC: 185–221.

59. **Menard, J.L., Roussel, P., Masselin-Silvin, S., Puthod, R., Hetreau, T., Foret, A., Houssin, B., Aracil, C. and Le Guenic, M.** (2004). Contamination bactérienne d'une litiére de stabulation libre paillée: effet de la fréquence de paillage et proposition d'une

méthode pour son évaluation. In: Rencontres sur les Recherches autour des Ruminants. Institut de l'Elevage – INRA, Paris, **11** : 333–336.

60. **Mora, D., Scarpellini, M., Franzitti, L., Colombo, S et Galli, A.** (2003). Reclassification of Lactobacillus maltaromicus (Miller et al., 1973) DMS 20342 (T) and DMS 20344 and Carnobacteriumpiscicola (Collins et al., 1987) DSM 20730 (T) and DSM 20722 carnobacteriummaltoromanicumcomb. Nov. Int. J. S vst. Evol. Microbiol. **53**: 675-678.

61. **Muthukumarasamy, P., Holley, R.A.** (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated Lactobacillus reuteri. International Journal of Food Microbiology, **111**: 164-169.

62. **Nakata H, Hasegawa H, Sakurai H, Tamura M.**(2010). Distinctive Flavor and Strong Antifungal Activity in a Sourdough Bread Made Using Unique Lactic Acid Bacteria Obtained from a Sugar Factory, Nippon Shokuhin Kagaku KogakuKaishi, **57**: 85-90.

63. **Ndagano D.**(2011). Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires fermentés et caractérisation de leurs métabolites inhibiteurs, Ph.D, Thèse, Université de Liège.

64. **Nougounu C. J., Ndjouenkeu R., Mbofung C.M.F. et Noubi L**. (2003). Mise en évidence de la biodisponibilité du calcium et du magnésium au cour de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caille de zébu. J. Food. Eng. **57**: 301.

65. **Ouadghiri M.**(2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V–agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc. 132 p.

66. **Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, G., Lefebvre, K. and Swings, J.** (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk _lben'. J. Appl. Microbiol. **106** : 486–495.
67. **Rahali, V. and Menard, J.L.** (1991). Influence des variants génétiques de la B-lactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait,* **71**: 275–297.

68. **Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N. and Traore, A.S**. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermeted milk. Pakistan. J. Nutr. **3(3)**: 174-179.

69. **Savijokie K., Ingmer H. ET Varmanen P**. (2006)**.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **71** : 394-406.

70. **Schaasfsma, G.** (2008)**.** Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. Int. DairySci. **18**(**5**): 458–465.

71. **Schmidt, d. L., Tourneur, C., Lenoir, J**.(1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologie laitiére. In : Bactéries lactique, Vol 2. Ed. Loricalavoisier, pp. 37-54.

72. **Sevi, A., Albenzio, M., Muscio, A., Casamassima, D. and Centoducati, P.** (2003)**.** Effects of litter management on airborne particulates in sheep houses and on the yield and quality of ewe milk. Livest. Prod. Sci. **81**: 1–9.

73. **Sevi, A., Massa, S., Muscio, A., Dell'aquila, S.D.D. and Catalano, S.** (1998)**.** Litter treatment with bentonite or paraformaldehyde: effects on air quality and on milk yield of Comisana ewes. Zootec. Nutr. Anim. **24**: 213–224.

74. **Shekh R, Upadhyay K, Singh S.M, Roy U.** (2009**).** Inhibition of Candida albicans and two selected Gram-negtive pathogens by Polar Enterococcus faecalis and Carnobacterium sp., Research Journal of Microbiology, **4** : 138-142.

75. **Shekh R.M, Roy U.**(2012). Biochemical characterization of an anti-Candida factor produced by Enterococcus faecalis, BMC Microbiology, 12, 132.

76. **Soryal, K.A., Zeng, S.S., Min, B.R. and Hart, S.P.** (2004). Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk domiati cheese. Small Ruminant Re,.**52**: 109–116.

77. **Steinkraus, KH.** (1996**).** Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd Edition Revised and Enlarged. New York, NY: Marcel Dekker. pp. 776.

78. **Tantaoui-ElarakiI,A., Berrada, M., EL Marrakechi, A., et Berramou, A.**(1983). Etude sur le lbenMarocain,Le lait **63** (**198**) 230-245.

79. **Thieulon M.** (2005). Recherche des staphylocoques pathogène dans le lait et les produits laitiers. Revue de la chambere d'agriculture du Cantal.1-4.

80. **Tourette, I., Messad, S. et Faye, B.** (2001). Interactions entre les pratiques de traite et la qualité sanitaire du lait de chamelle en Mauritanie. Atelier Int. Sur le lait de chamelle en Afrique. FAO-CIRAD-KARKARA, Niamey, 5-8/11/03.

81. **V. Juillard, H.E. Spinnler, M.J. Desmazeaud, C.Y. Boquien.(**1987). Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Le Lait, INRA Editions, 67 (2), pp.149-172.

82. **Valerio F, Favilla M, DeBellis P, Sisto A, De Candia S, Lavermicocca P.** (2009). Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated froma semolina ecosystem against Penicilliumroqueforti, Aspergillus niger and Endomycesfibuliger contaminating bakery products, Systematic and Applied Microbiology**, 32**:438-448.

83. **Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. and Swings, J**. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407.

84. **Vignola, C**. (2002). Science et Technologie du Lait Transformations duLait. Edition Presses Internationales Polytechnique,Canada,250 p.

85. **Verne-bourdais E, Bonnefy C, Guille et Leyral. G.(2002**). Microbiologies et qualité Dans les industries agroalimentaire.

86. **Wareing, P.** (2005)**.** On farm HACCP for milk production. Int. Food Hyg. **16**: 9–1.

87. **Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G.** (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. Int. Dairy J, **12**: 91–109.

88. **Zalacain, I., Zapelena, M.J., Astiasaran, I., Bello, J**. (1996). addition of lipase from candida cylindracea to a traditional formulation of a dry fermented sausage. *meat science*, **42**: 155-163.

89. **Zamfarie, M.,Vavcanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., and De Vuyst, L**. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. Syst. Appl. Microbiol**. 29**: 487-495.

Annexes

Annexe I

Tableau I : Résumé de l'observation microscopique des 18 souches de LAB

Code de la souche	Gram	Forme	Mode d'association
Lb 1	+	Petit bâtonnets	chainettes
Lb 2	+	Petit bâtonnets	chainettes
Lb 3	+	Bacille	chainettes
Lb 4	+	Petit bâtonnets	chainettes
Lb 5	+	Bacille	chainettes
Lb 6	+	Bacille	chainettes
Lb 7	+	Petit gros bacille	
Lb 8	+	Bacille	chainettes
Lb 9	+	Bacille	chainettes
Ln 1	+	Cocci	Diplocoques
Ln 2	+	Cocci	Diplocoques
Ln 3	+	Cocci (ovoïde)	Diplocoques
Ln 4	+	Cocci	Diplocoques, petites chainettes
Lc 1	+	Cocci	Chainettes, diplocoques
St	+	Cocci	Amas
P	+	Cocci	Diplocoques
Lc 2	+	cocci	Diplocoques
Lc 3	+	Cocci	Diplocoques, chainettes.

Tableau II : La cinétique d'acidification (pH) des souches lactiques**.**

souches durée	0h	2h	4h	6h	24h	48h
Lb1	6 ,28	6,13	6,29	5,73	4,53	4,6
Lb2	6,44	6,34	6,07	5,87	4,78	4.58
Lb3	6,46	6,44	6,1	5,95	5,5	5.34
Lb4	**6,3**	**6,3**	**6,03**	**5,69**	**5,27**	**4.26**
Lb5	6,26	6,18	6,17	6,07	5,74	5,49
Lb6	6,45	6,6	6,37	6 ,21	6,09	5,49
Lb7	**6,43**	**6,19**	**6.05**	**5,65**	**4,81**	**4,57**
Lb8	6,34	6,22	6,19	5,8	4,71	4,42
Lb9	6.44	6,43	6,26	5,89	4,9	4,6
Ln1	**6,63**	**6,4**	**6,13**	**5,76**	**4,49**	**4,44**
Ln2	6,38	6,44	6,3	6,08	4,91	4,59
Ln3	6,64	6,68	6,67	6,68	6,14	5,47
Ln3	6,3	6,3	6,15	5,76	5,01	4,49
Lc1	**6,78**	**6,35**	**6,1**	**5,96**	**4,93**	**4,46**
St1	6,56	6,68	6,68	6,67	5,64	5,39
P1	6,48	6,19	6,3	5,75	5,43	4,57
Lc 2	6,4	6,24	6,23	5,79	4,68	4,4
Lc 3	6,29	6,49	6,32	6,16	5,44	4,7

Tableau III : Evolution de l'acidité Dornic des souches lactiques.

souches durée	0h	2h	4h	6h	24h	48h
Lb1	18	20	22	24	50	61
Lb2	12	22	24	30	42	66
Lb3	19	20	24	30	46	54
Lb4	16	19	20	30	46	69
Lb5	15	16	20	23	40	43
Lb6	13	12	14	21	22	41
Lb7	16	20	24	28	46	67
Lb8	20	22	22	26	44	71
Lb9	20	18	22	24	53	55
Ln1	14	20	24	30	58	65
Ln2	20	20	26	35	52	55
Ln3	15	15	19	17	22	44
Ln4	21	24	29	38	48	70
Lc1	13	22	29	34	53	80
St1	16	15	16	16	44	55
P1	18	24	24	32	44	65
Lc 2	20	22	28	26	50	65
Lc 3	16	19	17	18	30	40

Tableau IV : La variation du pH (Δ pH) des souches lactiques

Souches heures	0h	2h	4h	6h	24h	48h
Lb1	0	0,15	0,01	0,55	1,75	1,68
Lb2	0	0,1	0,37	0,57	1,66	1,86
Lb3	0	0,02	0,36	0,51	0,96	1,12
Lb4	0	0	0,27	0,61	1,03	2,04
Lb5	0	0,08	0,09	0,19	0,52	0,77
Lb6	0	0,15	0,08	0,24	0,36	0,96
Lb7	0	0,24	0,38	0,78	1,62	1,86
Lb8	0	0,12	0,15	0,54	1,63	1,92
Lb9	0	0,01	0,18	0,55	1,54	1,84
Ln1	0	0,23	0,53	0,88	2,14	2,19
Ln2	0	0,06	0,08	0,3	1,47	1,79
Ln3	0	-0,04	-0,03	-0,04	0,5	1,17
Ln4	0	0	0,15	0,54	1,29	1,81
Lc1	0	0.43	0,68	0,82	1,85	2,32
St1	0	-0.12	-0,12	-0,11	0,92	1,17
P1	0	0.29	0,18	0,73	1,05	1,91
Lc2	0	0.16	0,17	0,61	1,72	2
Lc3	0	-0.2	-0,03	0,13	0,85	1,59

Tableau V : Les résultats de pH du lait inoculé par des souches lactiques en culture mixte

Durée souche	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h	48h
Ln1+Lc+Lb4	6,03	5,88	5,72	5,7	5,58	5,4	5,5	4,58	4,48
Ln1+Lc+Lb7	6,12	5,92	5,81	5,71	5,54	5,52	5,37	4,62	4,5
Ln1+Lb4+Lb7	6,15	5,95	5,81	5,69	5,64	5,47	5,46	4,66	4,52
Ln1+Lb4+Lb7	6,28	5,92	5,84	5,7	5,63	5,49	5,49	4,65	4,51

Tableau VI: résultats de l'acidité Dornic dans le lait pour les souches lactiques en culture mixte.

Durée Souches	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h	48h
Ln1+Lc1+Lb4	26	34	37	35	35	46	48	86	92
Ln1+Lc1+Lb7	26	33	36	37	40	47	42	80	83
Ln1+Lb4+Lb7	28	31	35	36	36	46	49	77	82
Lc1+Lb4+Lb7	25	36	35	37	44	47	48	74	74

Tableau VII: la variation du pH (Δ pH) des souches lactiques en culture mixte.

Durée / Souche	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h	48h
Ln1+Lc1+Lb4	0	0,15	0,31	0,33	0,45	0,63	0,53	1,45	1,55
Ln1+Lc1+Lb7	0	0.2	0,31	0,41	0,58	0,6	0,75	1,5	1,63
Ln1+Lb4+Lb7	0	0,2	0,34	0,46	0,51	0,68	0,69	1,49	1,7
Lc1+Lb4+Lb7	0	0,36	0,44	0,58	0,65	0,79	0,79	1,63	1,77

Tableau VIII : résultats de la standardisation des souches lactique utilisées

Les souches lactiques	**Inoculum standard (10^9 UFC/ml)**
Lb 1	**1,5**
Lb 2	**2,9**
Lb 3	**3**
Lb 4	**1,2**
Lb 5	**5,2**
Lb 6	**1**
Lb 7	**3,2**
Lb 8	**3,6**
Lb 9	**2,8**
Ln 1	**4**
Ln 2	**2,5**
Ln 3	**2,8**
Ln 4	**6,2**
Lc 1	**6**
Lc 2	**4,3**
Lc 3	**3,8**

St 1	**2,7**
P 1	**2**

Tableau IX : résultats de la standardisation des souches pathogènes.

Souches	**[] UFC/ml après 24h d'incubation**
S.aureus	$1,3\times10^{9}$
***E.coli* ATCC 25922**	$4,5\times10^{8}$
Proteus sp	10^{9}
En.cloacae	10^{9}
K. pneumoniae	$1,7\times10^{10}$

Tableau X : résultats d'analyse microbiologique du lait cru

FTAM	La flore lactique	Levures et moisissures	Coliformes totaux	Coliformes fecaux	clostridium sulfito réducteur	staphyloc oque
2,69.10^{8}	9,1.10^{6}	1,1.10^{3}	ABS	ABS	ABS	ABS

Tableau XI : résultats du suivi microbiologique du l'ben1

	L'ben1			
Jours / Flore	FTAM	Bactéries lactiques sur milieu MRS et M17	Levures et Moisissures	Coliformes totaux
Jour 1	1,2 .10^{11}	7,2 .10^{10}	3,6 .10^{5}	Absence
Jour 4	6,2 .10^{10}	4,9 .10^{10}	3,7 .10^{5}	Absence
Jour 7	4,5 .10^{11}	8,5 .10^{8}	9,0 .10^{6}	Absence
Jour 10	2,7 .10^{10}	2,54 .10^{9}	1,4 .10^{6}	Absence

Tableau XIII : résultats du suivi microbiologique du l'ben2.

	L'ben2			
Jour / Flore	**FTAM**	**Bactéries lactiques sur milieu MRS et M17**	**Levures et Moisissures**	**Coliformes totaux**
Jour 1	$4{,}75 .10^{10}$	$3{,}25 .10^{10}$	$5 .10^{4}$	Absence
Jour 4	$2{,}2 .10^{11}$	$5 .10^{10}$	$1{,}8 .10^{4}$	Absence
Jour 7	$2{,}1 .10^{12}$	$1 .10^{12}$	$2{,}4 .10^{3}$	Absence
Jour 10	$2{,}4 .10^{9}$	$2{,}4 .10^{9}$	$3{,}21.10^{2}$	Absence

Tableau XIV : résultats du suivi microbiologique du l'ben3

	L'ben3	
Jours / **Flore**	**FTAM**	**Bactéries lactiques sur milieu MRS et M17**
Jour 1	$2,3 .10^{8}$	$1,4 .10^{7}$
Jour 4	$2,8 .10^{10}$	$1,4 .10^{10}$
Jour 7	$7,7 .10^{11}$	$2,7 .10^{10}$
Jour 10	$2,9 .10^{12}$	$1,5. 10^{11}$

Annexe II

1. **Réactifs**

La phénolphtaléine

Phénolphtaléine……1g

Alcool éthylique à 95°……..100 ml

Hydroxyde de sodium (NaOH) à 1/9 N

Hydroxyde de sodium…….. 40 g

Eau distillée ……. 1000 ml

Eau physiologique

Chlorure de sodium……. …….9g

Eau distillée……1000ml

Solution Hcl à 1N

Eau distillé …… ……... 1000 ml

Hcl …… ……... 4ml

2. **Milieux de cultures**

Bouillon MRS

Composition par litre

Peptone …… 10g

Extrait de viande ……. 10g

Extrait de levure …… 5g

Glucose ……... 20g

Tween 80 ……. 1 ml

Phosphate dipotassique …… 2 g

Acétate de sodium …… 5 g

Citrate triammonique …… 2 g

Sulfate de magnésium ……... 200 mg

Sulfate de manganèse …… 50 mg

pH = 6,5 stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes

Gélose MRS

Composition par litre

Peptone …… 10 g

Extrait de viande ……. 10 g

Extrait de levure …… 5 g

Glucose ……... 20 g

Tween 80 ……. 1 ml

Phosphate dipotassique …… 2 g

Acétate de sodium …… 5 g

Citrate triammonique …… 2 g

Sulfate de magnésium ……... 200 mg

Sulfate de manganèse …… 50 mg

Agar …… 18 g

pH = 6,5 +/- 0,1, stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes

Gélose nutritif

Composition par litre

Peptone de viande …….. 10 g

Extrait de viande …… 03 g

Extrait de leveur …… 03 g

Chlorure de sodium …….. 05 g

Agar ……. 18 g

pH = 7,2 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Bouillon nutritif

Composition par litre

Extrait de viande ……. 5g

Peptone …… 10g

Chlorure de sodium ……. 5g

pH = 7,3 +/- 0,2, Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Bouillon Roth

Composition par litre

Peptone……. 20 g

Glucose……. 5 g

Chlorure de sodium…….. 5 g

Phosphate dipotassique…… 2,7 g

Phosphate montassique…… 2,7 g

Azide de sodium…….. 0,4 g

Ethyl –violet…… 0,008 g

pH = 6,9 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Gèlose P.C.A

Composition par litre

Tryptone……. 5

Glucose……1

Extrais de la levure……2,5

Gèlose…….15

pH =7,0 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Bouillon EVA LITSKY

Composition par litre

Peptone de caséine…….. 20 g

Extrait de viande…….. 1,5 g

Glucose……..... 04 g

Chlorure de sodium…… 04 g

Phosphate dipotassique…….. 04 g

Phosphate monopotasique……2,7 g

Azide de sodium……..0,2 g

pH =7,0 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

. **Gèlose VRBL**

Composition par litre

Lactose…….. 10 g

Peptone……..…… 7 g

Chlorure de sodium……..……..... 5 g

Extrait de levure…….. 3 g

Sel billiaire…… 1.5 g

Rouge neutre…….0,03 g

Cristal violet…….. 0,02 g

Gèlose……15 g

pH =7,4 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Gèlose Baird Parker

Composition par litre

Tryptoptone…….. 2,50 g

Peptone pepsine de viande……... 2,50 g

Peptone papainique…….. 5 g

Extrait autolytique de levure…… 2.5 g

Extrait de viande…….. 5 g

Lactose……. 5 g

Glycérophosphate de sodium…….. 19 g

Sulfate de magnésium…….0,25 g

Acide ascorbique……. 0,5 g

Agar……..15 g

pH =7,1 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

Milieu SS (Salmonelle , Shigel)

Composition par litre

Extrait de viande de bœuf……05 g

Bio-polytone……05 g

Sel biliare…….8,5 g

Lactose……10 g

Citrate de sodiaum…….. 8,5 g

Thiosulfate de sodium…….8,5 g

Citrate ferrique……01 g

Vert brillant…….……. 0,330 g

Rouge neutre……. 0,025 g

Agar……13,5 g

Eau distillé…….1000ml

pH =7,0 Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes

O.G.A (Oxytétratacycline-Glucose-Agar)

Composition par litre

Extrait de leuver……. 5

Cholorure de sodium…….... 5

Glucose…….1.5

Agar…….12

pH =7,0 Stérilisation à 115 °C pendant 15 minutes

Annexe III

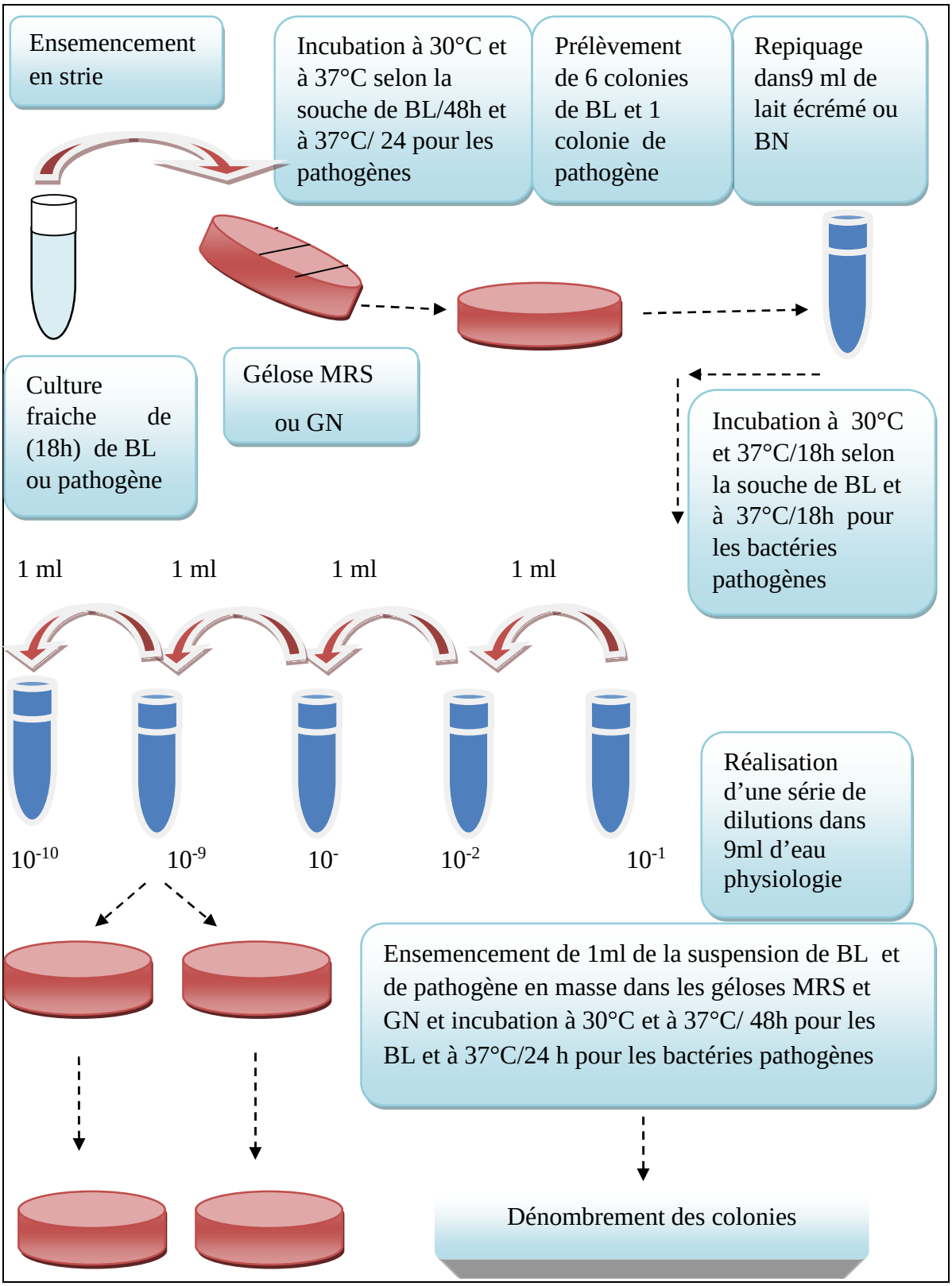

Figure 1: Standardisation de l'inoculum de Bactéries lactiques et pathogènes.

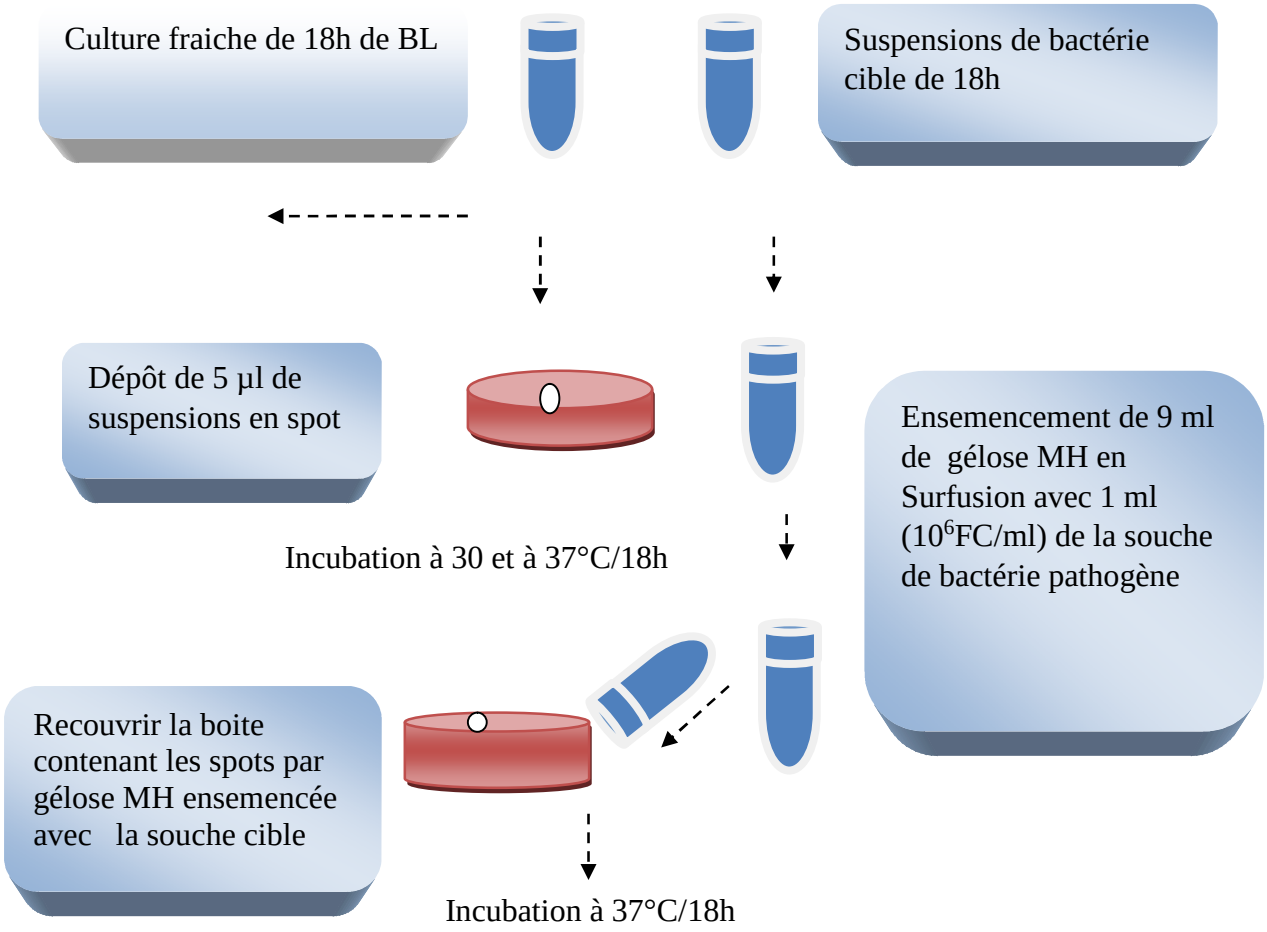

Figure 2 : Test de spots

Annexe IV

Figure 3 : Photos du lait de vache utilisé dans la mise au point du l'ben artisanal

Figure 4 : Maturation du l'ben

Résumé

Le suivie de la cinétique d'acidification en culture pure et mixtes des 18 souches lactiques ont montré que les souches Lb4, Lb7, Lc1 et Ln1 ont un pouvoir acidifiant important dans les premières heures d'incubation dans le lait écrémé stérile, (ΔpH 0,61; 0,68; 0,8; 0,87 après 6h d'incubation), En effet, la combinaison la plus acidifiante était Lc1+Lb4+Lb7 avec un pH de 5,49 et une acidité de 42 °D après 6heures d'incubation et d'un pH de 4,62 et une acidité de 80°D après 24h d'incubation. Pour cela, cette combinaison est sélectionnée pour la mise au point de l'ben artisanal. En parallèle, une étude de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées a été réalisée. Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne par le test des spots à l'égard de *S.aureus, E.coli*ATCC 25922,*Proteus sp, En.cloacae, K. pneumoniae*ont ont montré que toutes les souches testées inhibent ces pathogènes avec des zones d'inhibitions allant jusqu'au 48mm.

La combinaison la plus acidifainte Lc1+Lb4+Lb7 a été utilisée dans la mise au point du l'ben2 (Flore autochtone du lait cru+ferments), l'ben3 (lait de vache pasteurisé+ferments) et le l'ben1 a été réalisée par le lait cru (flore autochtone du lait cru seulement.) qui est consédéré comme témoin.

Les résultats d'analyses microbiologiques des trois types de L'ben au cours de la consevation à 6°C ont révelé que la FTAM et les bactèries lactiques des L'ben1 et L'ben2 diminuent au bout de dixieme jour de conservation, contrairement au L'ben3 où ces flores augmentent au bout de dixieme jourdurant la meme période. Les levures et moisissures du l'ben2 diminuent au cours de la conservation. Cela peut s'expliquer par l'activité antifongique de la combinaison sélectionée.

En résumé, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent, l'utilisation de ces souches lactiques (Lc1, Lb4 et Lb7) non seulement comme agent acidifiants mais aussi comme bioconservateurs dans la mise au point de produits laitiers fermentés.

Mots clés : bactéries lactiques, pouvoir acidifaint, pouvoir antibactérien, cultures mixtes, L'ben artisanal.

ABSTRACT

The follow-up of the acidification kinetics in pure and mixed culture of the 18 lactic strains showed that the Lb4, Lb7, Lc1 and Ln1 strains had an important acidifying power in the first incubation hours in the sterile skim milk, (ΔpH In fact, the most acidifying combination was Lc1 + Lb4 + Lb7 with a pH of 5.49 and an acidity of 42 ° D (0.61, 0.68, 0.8, 0.87 after 6 h of incubation) After 6 hours of incubation and a pH of 4.62 and an acidity of 80 ° D after 24h of incubation. For this, this combination is selected for the development of the ben craft. In parallel, a study of the antibacterial activity of the selected strains was carried out. The results of the study of the antibacterial activity by the spots test with respect to *S. aureus, E. coliATCC 25922, Proteus sp.,En.cloacae, K. pneumoniaeon*t have shown that all the strain stested inhibit these pathogens With zones of inhibitions up to 48mm.

The most acidifeous combination Lc1 + Lb4 + Lb7 isused in the development of ben2 (raw milk + ferments), ben3 (pasteurized cow milk + ferments) and ben1 By raw milk (indigenous flora of raw milk only) which is consigned as a control.

The results of microbiological analyzes of the three types of L'ben during the 6 ° C follow-up revealed that the FTAM and lactic bacteria of L'ben1 and L'ben2 decreased at the end of the 10th day, Ben3 where these flores increase at the end of the tenth day. However, the yeasts and mold of the ben2 decrease during storage. This can be explained by the antifungal activity of the selected combination.

In summary, the result sob tained in this study suggest the use of these lactic strains (Lc1, Lb4 and Lb7) not only as acidifying agents but also as bioconservatives in the development of fermented dairy products.

Keywords: lactic bacteria, acidifying power, antibacterial activity, mixed culture, L'ben