

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire Santé



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Comparaison du pouvoir acidifiant des
Bactéries lactiques isolées du lben et beurre
traditionnel**

Présenté par :

Benyoub Thinhinane & Kechtal Nadine

Soutenu le : **15 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M ^r Bensaid Karim	MAA	Président
Mme Benachour Karima	MAA	Promotrice
Mme Faradji Samia	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciement

*Avant tout, on remercie **DIEU** le tout puissant, le miséricordieux, de nous avoir données le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser ce travail dans de meilleures conditions.*

A notre promotrice Madame Benachour Karima

Vous nous avez toujours accueillis avec une grande sympathie et bienveillance tout au long de ce travail, vous nous avez guidées dans la méthodologie de recherche et avec votre aide précieuse et vos remarques constructives, nous avons parvenue à achever ce travail.

On vous remercie très sincèrement pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré vos nombreuses obligations. Votre disponibilité, votre écoute

Veillez trouver ici, le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Madame Faradji Samia

Nous sommes très honorées que vous acceptiez d'examiner notre travail.

Trouvez ici le témoignage de nos totales gratitudees.

Sincères remerciements.

A Monsieur Bensaid karim

Nous sommes très honorées que vous acceptiez de présider notre travail.

Trouvez ici le témoignage de nos totales gratitudees.

Sincères remerciements.

Très nombreux sont les gens qui, de prés ou de loin, ont participé a la réalisation de ce travail. Tout on s'excusant auprès d'eux de ne pas les citer, on leur exprime nos vives reconnaissances.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à ;

Mes chers parents, pour leurs dévouements,

*Leur amour, leurs sacrifices et leurs encouragements jusqu'au bout, que Dieu leurs accorde
une longue vie et encore une fois*

Merci

A la source de la tendresse, de patience et de générosité,

Ma mère

A celui qui m'a appris que la patience est le secret du succès,

Mon père

A la mémoire de ma grand-mère, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis

*Mes chères sœurs, pour leurs soutiens et l'encouragement qu'elles m'ont offert, l'occasion
m'est enfin donné de vous exprimer mon attachement le plus profond les mots ne sauraient
traduire avec exactitude mon affection a votre égard.....je vous souhaite tout le bonheur.*

Mes chers frères, leurs épouses et leurs enfants à qui je souhaite une longue et belle vie.

Mes beaux frères qui méritent tous le bien.

Mes adorables neveux.

*Mon très cher fiancé Samir qui ma beaucoup encourager et soutenue tout au long de mes
études*

A toute ma belle famille

*A mon cher binôme Nadine et sa famille pour la sœur qu'elle était et qu'elle restera pour
moi, pour tous les merveilleux moments passés ensemble qu'ils soient encore nombreux.*

A ma copine Djamilia

*En fin, à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment
ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu*

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

Thinhinane

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce travail à :

Celle qui m'a donné tout sans rien en retour, la plus chère personne

Ma tendre mère

Celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière, celui qui a combattu toute sa vie pour me procurer tout ce dont j'avais besoin

Mon très cher père

Mes chères sœurs, Sabine et Karine, pour le soutien et l'encouragement qu'elles m'ont offert, l'occasion m'est enfin donné de vous exprimer mon attachement le plus profond, les mots ne sauraient traduire avec exactitude mon affection à votre égard.... Je vous souhaite tout le bonheur du monde

Mon adorable petit frère, à toi la plus belle chose qui me soit arrivé dans ma vie

Mon cher binôme et sa famille... pour la sœur qu'elle était et restera pour moi, tous les merveilleux moments passés ensemble, qu'ils soient encore nombreux

A ma très chère équipe du RCB, président, encadrement technique et administratif et joueuses, pour tout le plaisir et la joie que vous me portez

A mes véritables amies Ryma, Kamy et widad qui me procurent chaque jour joie et bonheur

A mon très cher ami wahab qui occupe une énorme place dans mon cœur

En fin, à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu

Et

A Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

Nadine

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1- Généralité sur les bactéries lactiques.....	01
2- Historique.....	02
3- Habitat.....	02
4- Classification et taxonomie	02-05
5- Activité acidifiante des bactéries lactiques	06
6- Mécanisme et réaction d'acidification.....	07
7- Conservation du beurre.....	07

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1- Origine des bactéries utilisé	08
2- Revivification des souches des bactéries lactiques.....	08
3- Vérification de la pureté des souches	09
4-Observation macroscopique et microscopique	09
5-Coloration de Gram et test de catalase.....	09
6-Type fermentaire et mobilité des souches	10
7-Standardisation des souches de bactéries lactiques.....	10
8- Croissance des souches à pH=3	12
9-Suivie de la cinétique de croissance et d'acidification.....	12
10- Suivie de la cinétique d'acidification en culture mixte.....	15

Chapitre III : Résultats et Discussion

1-Vérification de la pureté des souches.....	16
2- Standardisation des souches de bactéries lactiques.....	19
3 -Croissance des souches de bactéries lactiques à pH= 3	20
4- Cinétique de croissance et d'acidification en culture pure sur bouillon MRS.....	21-27
4.1- cinétique de croissance.....	21-23
4.2- cinétique d'acidification.....	24-27
5- Variation de pH et de la capacité maximale d'acidification lors de la fermentation sur bouillon MRS.....	28-29
6- Etude de la vitesse d'acidification de bactéries lactiques en culture pure à partir de la variation de pH lors de la fermentation.....	30
7- Cinétique d'acidification des souches de bactéries lactiques dans le lait.....	31-34
8- Variation de pH et de la capacité maximale d'acidification lors de la fermentation dans le lait.....	35-36
9- Etude de la vitesse d'acidification des souches de bactéries lactiques en culture pure à partir de la variation de pH lors de la fermentation.....	37-38
10- Cinétique d'acidification dans le lait en culture mixte.....	38-39
11- Variation de pH et de Cm en culture mixte lors de la fermentation dans le lait.....	40-41
12- Etude de la vitesse d'acidification des souches des bactéries lactiques en culture mixte à partir de la variation de pH lors de la fermentation.....	42-43
Conclusion	44
Références.....	45-50
Annexes	

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Représentation des souches de bactéries lactiques	08
II	Aspect macroscopique de quinze souches de bactéries lactiques et leurs types de fermentation.	18
III	Résultats de la standardisation des souches de bactéries lactiques.	19
IV	Appréciation de la croissance des souches par rapport au témoin.	20

Liste des tableaux en annexe

N°	Intitulé	annexe
I	Mesure du pH de différentes souches en fonction du temps sur bouillon MRS.	VI
II	Mesure de l'acidité titrable de différentes souches en fonction du temps sur bouillon MRS.	VI
III	Mesure du pH de différentes souches en fonction du temps dans le lait.	VI
IV	Mesure de l'acidité titrable de différentes souches en fonction du temps dans le lait.	VI
V	Mesure du pH de différentes souches en fonction du temps dans le lait.	VI
VI	Mesure de l'acidité titrable de différentes souches en fonction du temps dans le lait.	VI
VII	Suivie de la densité optique des souches de bactéries lactique sur bouillon MRS.	VI

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
01	Distance phylogénétique entre les genres principaux constituant les bactéries lactiques basées sur les séquences d'ARNr 16S.	04
02	Revivification et vérification de la pureté de la souche.	11
03	Titrimétrie.	14
04	Aspect macroscopique des colonies d'une souche de <i>Leuconostoc</i> sur gélose MRS.	16
05	Aspect macroscopique des colonies d'une souche de <i>Lactobacille</i> sur la gélose MRS.	16
06	Aspect microscopique des souches après coloration de Gram.	17
07	Cinétique de croissance de quinze souches de bactéries lactiques sur bouillon MRS (a, b, c, d, e).	21-23
08	Evolution du pH et de l'acidité de quinze souches de bactéries lactiques (a, b, c, d, e, f).	24-26
09	Représentation graphique de mesure de Δ pH de différentes souches de bactéries lactiques.	28
10	Représentation graphique de mesure de Cm de différentes souches de bactéries lactiques.	28
11	Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures des 4 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques sur bouillon MRS.	30
12	Evolution du pH et de l'acidité de quinze souches de bactéries lactiques (a, b, c, d, e).	31-33
13	Représentation graphique de mesure de Δ pH de différentes souches de bactéries lactiques.	35
14	Représentation graphique de mesure de Cm de différentes souches de bactéries lactique.	35
15	Evolution de la variation du pH durant des 6 premières heures de 4 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques dans le lait.	37
16	Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures de 3 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques dans le lait.	37
17	Evolution du pH des souches en culture mixte dans le lait.	38
18	Evolution de l'acidité des souches en culture mixte dans le lait.	39
19	Représentation graphique de mesure de Δ pH de différentes souches de bactéries lactiques en culture mixte.	40
20	Représentation graphique de mesure de Cm de différentes souches de bactéries lactiques en culture mixte.	40
21	Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures de 4 souches en culture mixte dans le lait.	42

Introduction

INTRODUCTION

Une grande variété de produits laitiers fermentés sont préparés traditionnellement en Algérie dans le but est la bioconservation du lait pour une utilisation ultérieure. Ces produits font partie de l'héritage Algérien et ont une grande importance culturelle, médicinale et économique, ils ont été développés sur une grande période (**Benkerroum et al., 2004**).

Le beurre est essentiellement fabriqué dans les régions d'élevage de bovins. Ce produit étant un dérivé du lait, constitue un habitat pour les bactéries lactiques (**Cogan et al., 1997 ; Desmazeaud, 1996**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles pour l'Homme, lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre très important d'aliments. Ces bactéries sont déjà reconnues par la production des acides organiques qui abaissent le pH des aliments, ce qui empêche la prolifération des germes nuisibles. La production de CO₂ par les bactéries lactiques réduit le potentiel d'oxydoréduction et inhibe les germes aérobies tels que les moisissures (**Desmazeaud, 1992**).

En agroalimentaire, les bactéries lactiques sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et la qualité des produits alimentaires fermentés (lait fermenté, beurre, olives) (**Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Tailliez., 2001**).

L'objectif de cette étude est de comparer le pouvoir acidifiant à l'aide d'une méthode expérimentale standardisé entre les souches de bactéries lactiques apparentant aux deux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Pour cela, on a structuré cette étude de la façon suivante :

- Dans un premier temps, nous avons déterminé le taux des bactéries lactiques à t=0h cultivées dans le lait écrémé et dans le bouillon MRS par mesure de la densité optique sur bouillon MRS et par dénombrement sur le lait.
- Puis, un suivie du pouvoir acidifiant de quinze souches en réalisant la titration par NaOH et en mesurant le pH dans un intervalle de temps régulier pendant 48h.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1- Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du siècle (**Klontz et Desenclos, 1990**) et réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique.

La première définition des bactéries lactiques basée sur la capacité de fermenter et de coaguler le lait, englobait les bactéries coliformes et lactiques. En 1901 Beijerinck observe que les Lactobacilles sont des bactéries de Gram positif, ce qui séparera définitivement les bactéries lactiques (à Gram positif) des bactéries coliformes (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, chimioorganotrophes, non pathogènes, à Gram positif, généralement immobiles, non sporulées, anaérobies mais aérotolérantes (**Novel, 1993**), ne possédant pas la catalase, ni la nitrate réductase, ni la cytochrome oxydase, ne liquéfiant pas la gélatine, et ne produisant pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Afin de se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (**Prescott et al, 1999**).

Les bactéries lactiques peuvent avoir un métabolisme homofermentaire, hétérofermentaire facultatif ou hétérofermentaire strict (**Vandamme et al, 1996**).

La plupart des bactéries lactiques participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés pour lesquels elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment. Elles sont également impliquées dans les phénomènes d'altération de certaines catégories de denrées alimentaires. Leur caractère pathogène est en revanche extrêmement réduit puisque seules certaines espèces des genres *Streptococcus* et, dans certaines conditions, *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections Humaines (**Laurent et al., 1998**).

2 - Historique des bactéries lactiques :

L'utilisation de la fermentation par L'Homme remonte à des temps très anciens. Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant J.C (fox, 1993). Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries (Alice et Sanchez rivas, 1997). La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Josef lister en 1873 (Azcarate-Peril et al., 2004).

3 - Habitat :

Les bactéries lactiques ont pour habitats de nombreux milieux naturels .Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales. Elles font partie de la flore intestinale et vaginale Humaine et animale (Zarour et al., 2012) mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986).

4 - Classification et taxonomie :

La première classification des bactéries lactiques a été établie par Orla-jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001).

Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètement les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour l'ARN16S ribosomiques.

D'après Ludwig et al, (2008), le phylum firmicute comprend trois classes : Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres (**Holzaphel et al., 2001**).

Tous les genres principaux des bactéries lactiques décrites sont classés dans les mêmes phylums, classe et ordre. Seuls varient les familles et les genres.

Actuellement les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobactérium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (**Dortu, Thonart, 2009**).

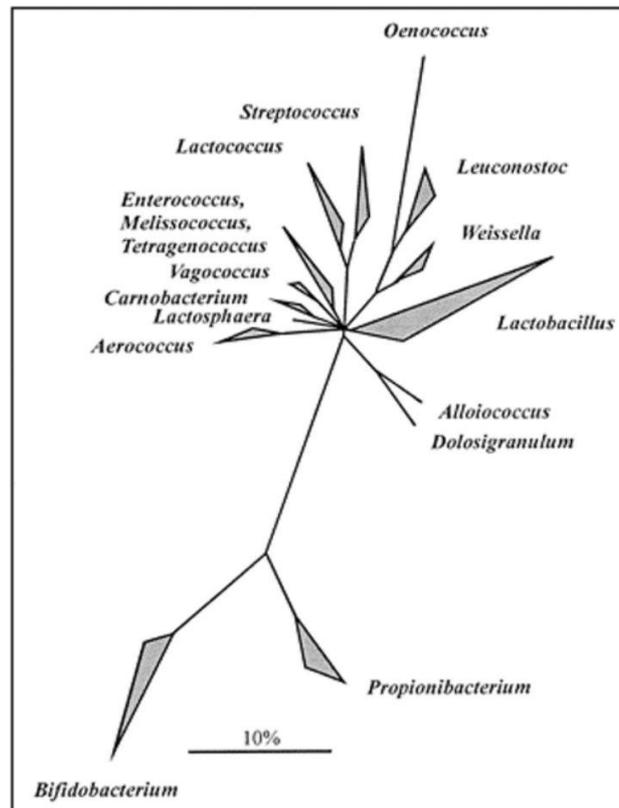


Figure 1 : Distance phylogénétique entre les genres principaux constituant les bactéries lactiques basées sur les séquences d'ARNr 16S (**Schleifer et Ludwig, 1995**).

4.1- Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation G+C %. La classification remaniée par Kandler et Weiss (**Gupta et al., 1992**), les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

- Groupe I: il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophile (croissance à 45°C) dont *Lb.delbrueckii*, *Lb. Acidophiles* et *Lb. Helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'Homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux) et participe à l'équilibre de la microflore de l'organisme ;

- groupe II : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capable d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions, comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb.plantarum*, *Lb.casei*, *Lb.curvatus*, *Lb.sake*, majoritairement mésophiles. Ils sont isolés à partir des fourrages, les produits laitiers et les produits carnés ;
- groupe III : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. Kefir* et *Lb.sanfransisco*. Outre leurs présences dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale.

4.2- Le genre *Leuconostoc* :

Il rassemble les coques lenticulaires en paires ou chaînettes, mésophiles, qui possède un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère une activité aromatique importante. D'autre synthétisent des dextrans en présence de saccharose (Chowdhury et al., 1987). Ce genre comporte 7 espèces présentes majoritairement dans les produits végétaux, mais elles sont également isolées dans les produits laitiers et le vin.

5 - Activité acidifiante des bactéries lactiques :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisée, dans les industries alimentaires. En effet, l'acidification a pendant très longtemps, constitué une méthode privilégiée de conservation des aliments traditionnels, depuis les laits fermentés jusqu'aux végétaux (choucroute, olives...), alors que l'Homme ne disposait pas encore des techniques modernes de conservation, tel que l'appertisation et la congélation/surgélation.

Les progrès réalisés depuis plusieurs décennies, tant au niveau des connaissances scientifiques (principalement en génétique et en physiologie microbienne) que de l'industrialisation des procédés de fabrication (génie microbiologiques et alimentaire), n'ont pas modifié l'intérêt porté à cette faculté majeure des bactéries lactiques que constituent leurs potentiels acidifiant. Cependant, ils ont permis :

- ❖ De mieux comprendre les mécanismes et les réactions d'acidification ;
- ❖ De définir des méthodes permettant de mieux quantifier ce phénomène ;
- ❖ De développer des stratégies pour agir sur les propriétés acidifiantes des bactéries lactiques, et donc de mieux les maîtriser et les adapter aux spécificités recherchées (**George, François, 2008**).

Le processus d'acidification, étroitement associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique dans les milieux de culture. Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi (**Beal et al., 2008**) :

- ❖ Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- ❖ Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- ❖ Limitation des risques de développement de flores pathogènes et d'altération dans les produits finaux.

Dans le cas des produits laitiers d'autres phénomènes se manifestent, tel que :

- ❖ Déstabilisation des micelles de caséine et coagulation des laits (formation de caillés lactiques) ;

- ❖ Participation à la synérèse (expulsion de lactosérum) (**George, François, 2008**).

6- Mécanisme et réaction d'acidification :

L'acide lactique est le principal métabolite produit au cours de la croissance des bactéries lactiques thermophiles et mésophiles. Il s'agit d'un acide faible dont le pKa est égal à 3,9. Dans le lait et dans certains de ses dérivés, tel que le lactosérum et la crème, la production d'acide lactique s'effectue essentiellement à partir du lactose.

La majorité des bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers ont un métabolisme homofermentaire, c'est-à-dire qu'elles produisent presque exclusivement de l'acide lactique à partir des sucres. Le bilan de la réaction est alors de quatre moles d'acide lactique produit par un mole de lactose consommé. Cependant, les bactéries lactiques thermophiles sont souvent incapables de métaboliser le galactose issu de la scission du lactose, qui s'accumule alors dans le milieu de culture. Dans ce cas seules deux moles d'acide lactique sont produites à partir du lactose (**Georges et François, 2008**).

Les espèces hétérofermentaires produisent des quantités équimolaires d'acide lactique, de dioxyde de carbone et d'éthanol (ou d'acide acétique) (**Dellaglio, 1989 ; De vuyst, 2000**).

7- Conservation du beurre :

Le beurre fait maison se conserve peu de temps, maximum 48 heures, sinon il rancira.

Pour conserver du beurre deux à trois semaines, même hors réfrigérateur, il faut le mettre dans de l'eau à l'abri de la lumière. L'eau protège le beurre de l'oxydation. L'ajout de sel (environ 3 %) facilite également sa conservation.

Le beurre est microbiologiquement plus stable que le lait ou la crème, peut être attaqué par des souches lipolytiques, certaines levures et plusieurs moisissures qui provoquent l'apparition de taches colorées en surface ou goût de rance.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Microbiologie générale (Bloc N°9) de Université A/Mira de Béjaïa, durant la période allant du 23 janvier au 20 d'avril 2016.

1-Origin des bactéries utilisées :

Quinze souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc* et *Lactobacillus* ont été étudiées. Les souches sont isolées à partir du Lben et du beurre traditionnel collectés dans différentes régions de Bejaia.

Tableau I : Représentation des souches de bactéries lactiques.

Le genre	Les souches
<i>Lactobacillus</i>	Lacto 6 Lb
	Lacto 16 Lb1
	Lacto 16 Lb
	Lacto 8 Lb
	Lacto 3 Br
	Lacto 13 Br
	Lacto 15 Br
	Lacto 10 Lb
	Lacto 12 Lb
	Lacto 7 Br
	Lacto 13 Br
	Lacto 9 Br
<i>Leuconostoc</i>	Ln 18 Br
	Ln 7 Br
	Ln 3 Lb
	Ln 12 Lb

2-Revivification :

A partir des souches conservées à 4 °C, des pré-cultures successives ont été réalisées sur bouillon MRS (**Man Rogosa et Sharpe, 1960**) (**annexe I**).

Dans un premier temps, les souches ont étéensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon MRS à pH=6,5. Après 24 h d'incubation à 30°C, 0,5 ml ont été prélevé etensemencée dans 5ml de bouillon MRS stérile. Puis 1ml de ce bouillon a été repiqué dans 9 ml de MRS liquide puis incubée 24 h à 30 °C.

Des isolements sur gélose MRS, ont été aussi réalisés.

3-Vérification de la pureté des souches :

Avant toute utilisation des souches, une vérification de leur pureté est indispensable. Après quelques repiquages successifs, la pureté des souches est confirmée par des tests morphologiques inspirés du **Guiraud (2003) (figure 2)**.

4.- Observation macroscopique et microscopique :

4.1.- Observation macroscopique :

Sur gélose MRS, après une culture en surface, on peut caractériser les bactéries selon l'aspect des colonies formées. Plusieurs critères sont pris en compte : taille, forme et aspect.

4.2- Observation microscopique :

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne et leur mode de regroupement.

5- Coloration de Gram et test de catalase :

5.1- Coloration de Gram :

La coloration de Gram a été effectuée selon le Protocole décrit dans l'annexe II.

5.2- Test de la catalase :

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une anse stérile sur une lame de verre contenant une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. Le dégagement de bulles de gaz (d'oxygène) signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

6- Type fermentaire et mobilité des souches :

6.1- Type fermentaire :

La production de gaz à partir de la fermentation de glucose est étudiée dans le bouillon MRS contenant la cloche de Durham (Smelis et al., 1994 ; Hasaine et al., 2008) (Annexe II).

6.2- Mobilité des souches :

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40 sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool. Le renseignement obtenu par cette observation concerne principalement la mobilité des bactéries.

7 -Standardisation des souches de bactéries lactiques :

Afin d'étudier le pouvoir acidifiant des quinze souches de bactéries lactiques (11 souches de *Lactobacillus* et 4 souches de *leuconostocs*), une standardisation de l'inoculum est indispensable.

Les inocula des quinze souches de bactérie lactiques sont revivifiés par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 30°C pendant 48h, 2 à 3 colonies bien isolées de chaque souche sont repiquées à chaque fois dans 9 ml du bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18 h.

Au terme de l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans l'eau physiologique stérile (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-9}), 1 ml des dilutions (10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) est ensemencé en masse dans une gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 30°C pendant 48 h.

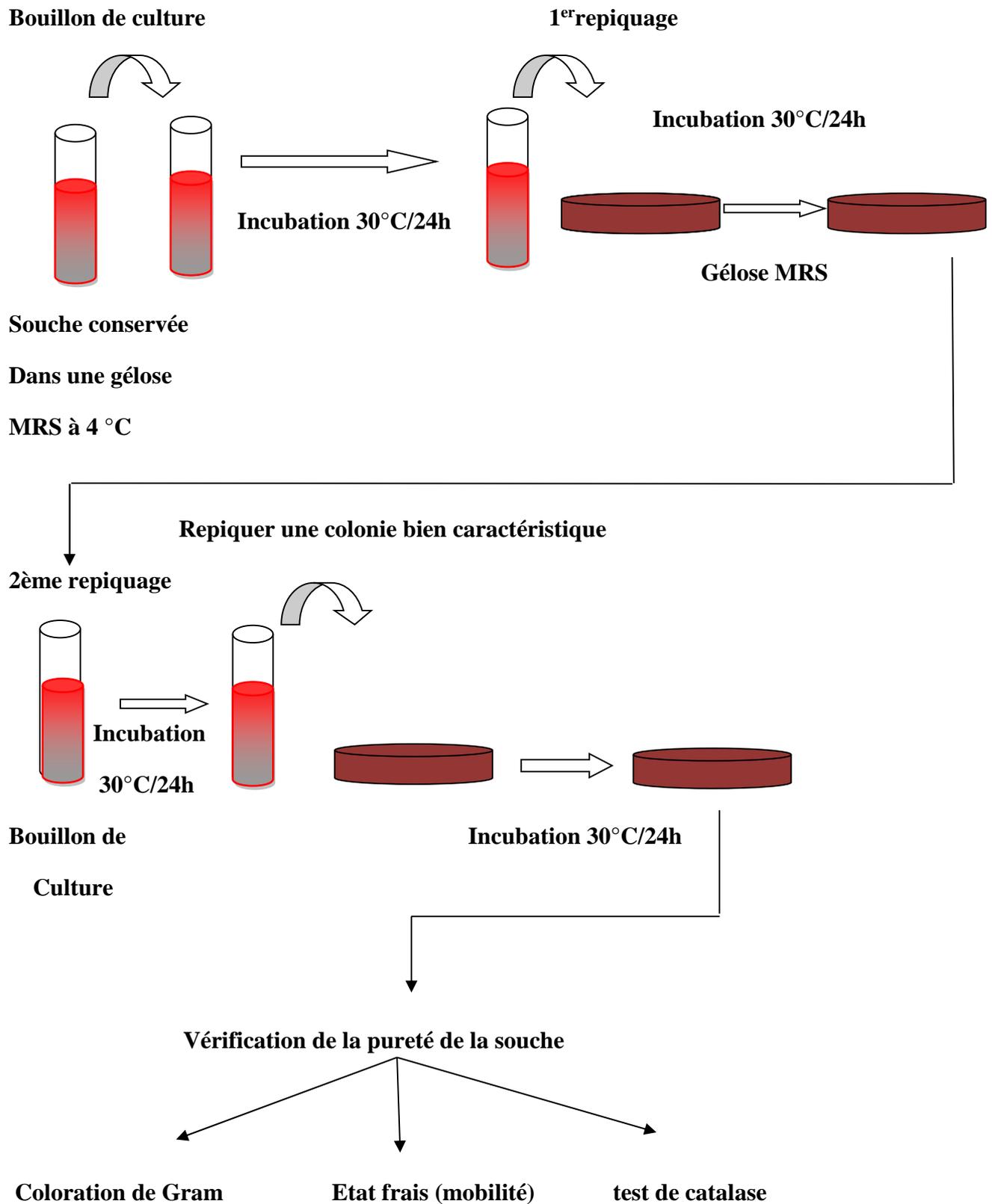


Figure 2 : Revivification et vérification de la pureté de la souche.

8- La croissance des souches à pH=3 :

Le but de ce test est de voir si les souches de bactéries lactiques croissent en milieu acide.

Après 3h-6h-24h d'incubation des souches à 30°C, on a procédé à une centrifugation.

Pour cela, il a fallu prélever, 1ml de chaque suspension, les mettre dans des epindorfs stériles, les placer ensuite dans une centrifugeuse de paillasse à 1000rpm, après 10min, récupérer le culot et le mettre dans 9ml de bouillon MRS a pH =3 et enfin incuber à 30°C/24h et mesurer la densité optique (DO).

8.1- mesure de a densité optique :

La mesure de la densité optique est effectuée a une longueur d'onde de 620 nm au spectrophotomètre de type UV/VIS UV-9200 (**Annexe III**).

9 -Suivre de la cinétique de croissance et d'acidification :

9.1- préparation des souches :

Pour obtenir une préculture, les souches conservées au réfrigérateur sont repiquées sur le bouillon MRS avec un inoculum de 0,3% et incubées à 30°C/24h. Cette préculture sert à inoculer le lait écrémé (candia) et le bouillon MRS dans des tubes de 10ml.

- Après 24h d'incubation à 30°C, 10ml de l'inoculum sont versés dans des flacons de 90ml de lait et de bouillon MRS, afin de suivre toutes les 3h, les cinétiques de croissance et d'acidification.

9.2 – cinétique de croissance :

La croissance à 30°C, des souches sont évaluées par la mesure de la densité optique au spectrophotomètre de marque (UV- 9200) à une longueur d'onde de 620nm.

9.2.1 – évolution du pH du lait et du bouillon MRS :

Les mesures du pH des deux milieux (lait et bouillon MRS) préalablement ensemencés avec les différentes souches est mesurés à l'aide d'un pH mètre de type (HANNA) (**annexe V**).

9.2.2 – mesure de l'acidité titrable :**9.2.2.1-but de la manipulation :**

Cette manipulation a pour but de déterminer par titrage la concentration molaire en ions H_3O^+ dans un échantillon de lait et de bouillon MRS. Cette concentration est exprimée en degré Dornic ($^{\circ}D$) puis convertie en g/l selon la formule :

1ml de NaOH \rightarrow 10 $^{\circ}D$ et 1 $^{\circ}D \rightarrow$ 0,01 d'acide lactique.

9.2.2.2- principe :

Le lait contient très peu d'acide et pas d'acide lactique. L'augmentation de l'acidité provient donc d'un développement important de la flore lactique influencée par la température et la durée de conservation du lait.

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait, est effectué toutes les trois heures selon la méthode normalisée par titrimétrie en utilisant une solution de NaOH à N/9, le titrage se fait sous agitation en présence de phénolphtaléine à 1%.

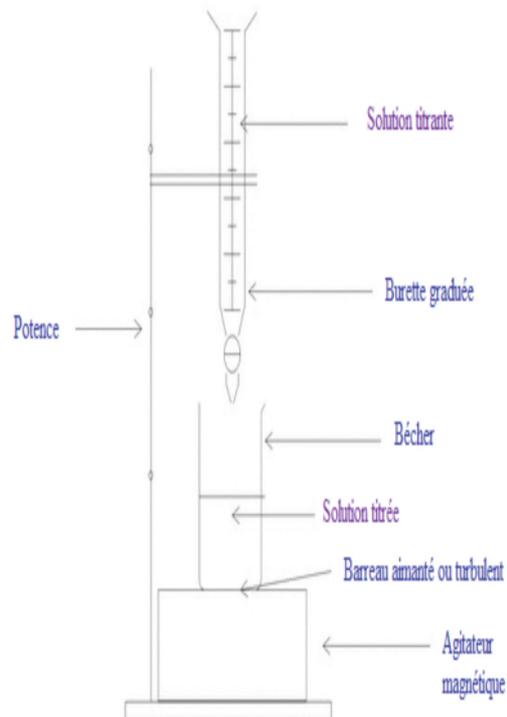


Figure 3: Titrimétrie

Remplir la burette de la solution de NaOH N/9 puis régler le niveau du liquide à 0.

A l'aide d'une pipette graduée stérile, 10ml de lait sont prélevés et transférés dans un bécher. Puis 3 gouttes de solution de phénolphaléine sont ajoutées et titrée jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante.

Le volume de solution titrante utilisée en 1/9 de millilitre est noté (**Guiraud, 1998**).

10 – suivie de la cinétique d'acidification en culture mixte :

L'association des bactéries lactique repose sur le choix de l'utilisation de trois meilleures souches pures présentant une bonne acidification qui sont : *Lacto 16 Lb*, *Lacto 8 Lb* et *Ln 18 Br* et deux autres souches pures présentant une acidification moyenne qui sont : *Lacto 7 Br* et *Lacto 10 Lb*.

Les cultures ont été préparées par la combinaison de la souche *Ln 18 Br* avec les quatre autre souches *Lacto 10 Lb*, *Lacto 7 Br*, *Lacto 16 Lb* et *Lacto 8 Lb*.

L'objectif est de vérifier si l'association de ces bactéries provoque un effet de symbiose.

Après 24 h d'incubation des souches à 30°C, on a procédé à une centrifugation.

Pour cela il a fallu de prélever grâce à une micropipette 1ml de chaque suspension, les mettre dans des epindorfs stériles puis les placer dans une centrifugeuse de paillasse à 1000rpm et après 10min et récupérer le culot et le mettre dans 5ml de lait pour *lacto 10 Lb*, *lacto 7 Br*, *lacto 6 lb1* et *lacto 8 Lb* et 20ml de lait pour *Ln 18 Br* enfin les incubé à 30°C/24h.

Afin de suivre les cinétiques d'acidification et de pH :

- dans des flacons contenant 90 ml de lait, on a associé 5ml de chaque souche avec 5ml de *Ln 18 Br*.

Chapitre III

Résultats et discussion

1- Vérification de la pureté des souches :

1.1- Caractérisation macroscopiques :

Sur gélose MRS, les souches apparaissent sous forme de petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire et de couleur blanchâtre ou crèmeuse, ronde plus-en moins bombées (figure 4 et 5).



Figure 4 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche de *Leuconostoc* sur gélose MRS.



Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche de *Lactobacillus* sur gélose MRS.

➤ **Test de catalase :**

Selon **Laurent et al (1998)**, les bactéries lactiques sont des bactéries à catalase négatif. Les résultats obtenus après le test de la catalase, sont de même pour toutes les souches (pas d'effervescence).

1.2- Observation microscopique :

➤ **Coloration de Gram :**

Les cellules observées après coloration de Gram sont bleues voilettes pour toutes les souches donc se sont de bactéries a Gram positif. Selon **Laurent et al (1998)**, Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif.

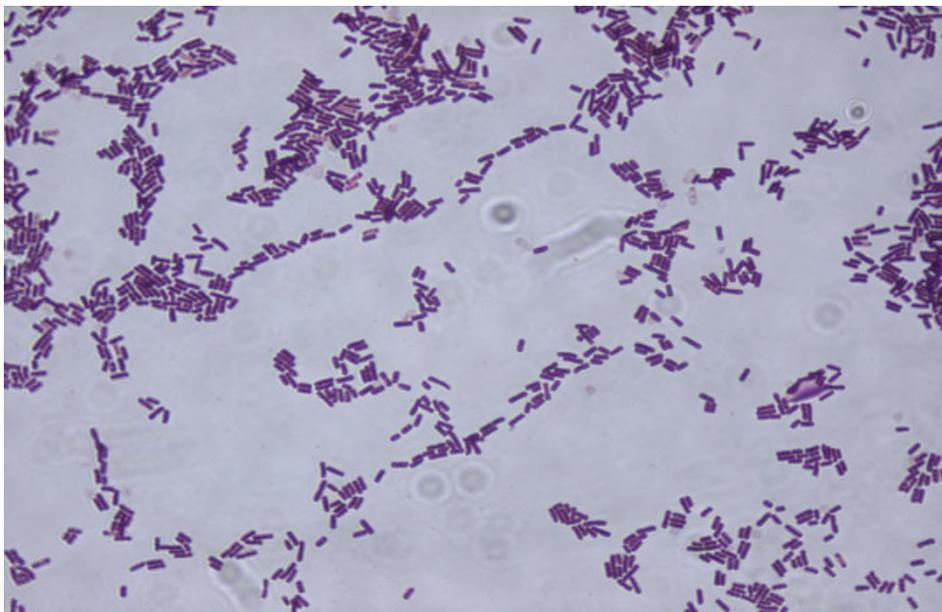


Figure 6 : aspect microscopique des souches de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* après coloration de Gram (Gx100).

Selon **Lenoir et al (1992)**, il existe deux grands groupes de bactéries lactiques morphologiquement bien distincts : les cocci et les bâtonnets.

L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélé deux formes de cellules : coques et bâtonnets. Les coques de formes ovoïdes ou rondes sont disposées en paires (diplocoques) ou en chainettes (courtes ou longues). Pour les bâtonnets nous avons soit la forme bacille ou bien coccobacilles.

Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Joffin et leyrat, 1996**) (Tableau II).

➤ **Type fermentaire :**

D'après les résultats obtenus, Le type fermentaire diffère d'une souche à une autre selon la production de gaz (Tableau II).

➤ **Mobilité des souches :**

Le test de mobilité indique que les quinze souches étudiées sont des souches immobiles, ce qui est cohérent avec les résultats de **Laurent et al (1998)** sur les bactéries lactiques.

Tableau II : aspect macroscopique de quinze souches des bactéries lactiques et leur type de fermentation.

Souches	forme	Production de gaz
<i>Lacto 6 Lb</i>	Bacille	Légère production
<i>Lacto 16 Lb1</i>	Bacille	+
<i>Lacto 16 Lb</i>	Bacille	-
<i>Lacto 8 Lb</i>	Bacille en chaînette	+
<i>Lacto 3 Br</i>	Bacille	+
<i>Lacto 15 Br</i>	Petit Bacille	Légère production
<i>Lacto 10 Lb</i>	Coccobacille	Légère production
<i>Lacto 12 Lb</i>	Bacille en chaînette	-
<i>Lacto 7 Br</i>	Bacille allongé	+
<i>Lacto 13 Br</i>	Coccobacille plus en moins allongé	Légère production
<i>Lacto 9 Br</i>	Bacille court	+
<i>Ln 18 Br</i>	Coccobacille	-
<i>Ln 7 Br</i>	Cocci allongé	+

<i>Ln 3 Lb</i>	Coccobacille	+
<i>Ln 12 Lb</i>	Cocci	-

2- Standardisation des souches de bactéries lactiques

Les résultats obtenus après la standardisation de quinze souches de bactérie lactique sont regroupé dans le tableau III :

Tableau III : Résultats de la standardisation des souches de bactéries lactiques.

Souches	Nombre de colonies prises	MRS normal	Lait écrémé
<i>Lacto 6 Lb</i>	2colonies	2×10^{10}	$5,3 \times 10^{10}$
<i>Lacto 9 Br</i>	3colonies	$1,04 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10}$
<i>Lacto 16 Lb</i>	3colonies	$0,5 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$
<i>Lacto 8 Lb</i>	2colonies	$1,5 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^{10}$
<i>Ln 18 Br</i>	2colonies	$3,2 \times 10^{10}$	1×10^{10}
<i>Ln 7 Br</i>	3colonies	$1,5 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
<i>Lacto 15 Br</i>	3colonies	$1,07 \times 10^{10}$	$6,2 \times 10^{10}$
<i>Ln 3 Lb</i>	3colonies	$2,1 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$
<i>Lacto 7 Br</i>	2colonies	$12,9 \times 10^{10}$	$9,8 \times 10^{10}$
<i>Lacto 10 Lb</i>	3colonies	$13,9 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
<i>Lacto 16 Lb1</i>	3colonies	$1,55 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{10}$
<i>Lacto 13 Br</i>	3colonies	$4,98 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
<i>Lacto 12 Lb</i>	3colonies	$1,05 \times 10^{10}$	9×10^{10}
<i>Ln 12 Lb</i>	3colonies	$1,2 \times 10^{10}$	$0,7 \times 10^{10}$
<i>Lacto 3 Br</i>	3colonies	$1,34 \times 10^{10}$	2×10^{10}

Après dénombrement des colonies des souches de bactéries lactiques sur gélose MRS, on constate que la croissance des souches est plus importante dans le lait que dans le milieu MRS à l'exception de *Ln18 Br*, *Ln 7 Br*, *Ln 3 Lb*, *Lacto 7 Br*, *Lacto10 Lb* et *Ln 12 Lb* qui présentent des valeurs respectives de $3,2 \times 10^{10}$, $1,5 \times 10^{10}$, $2,1 \times 10^{10}$, $13,9 \times 10^{10}$, $1,2 \times 10^{10}$.

Lacto 9 Br, *Lacto 8 Lb*, *Ln 15 Br*, *Lacto 7 Br* et *Lacto 12 Lb* ont une croissance très importante par rapport aux autres souches dans le lait.

Lacto 7 Br et *Lacto 10 Lb* sont les seules souches qui ont une croissance très importante dans le milieu MRS.

3- Croissance des souches de bactéries lactiques à pH= 3 :

La mesure de la densité optique sur bouillon MRS à pH = 3 a été effectuée et comparé avec le bouillon MRS à pH 6.5 l'estimation de la comparaison est représentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Appréciation de la croissance des souches par rapport au témoin.

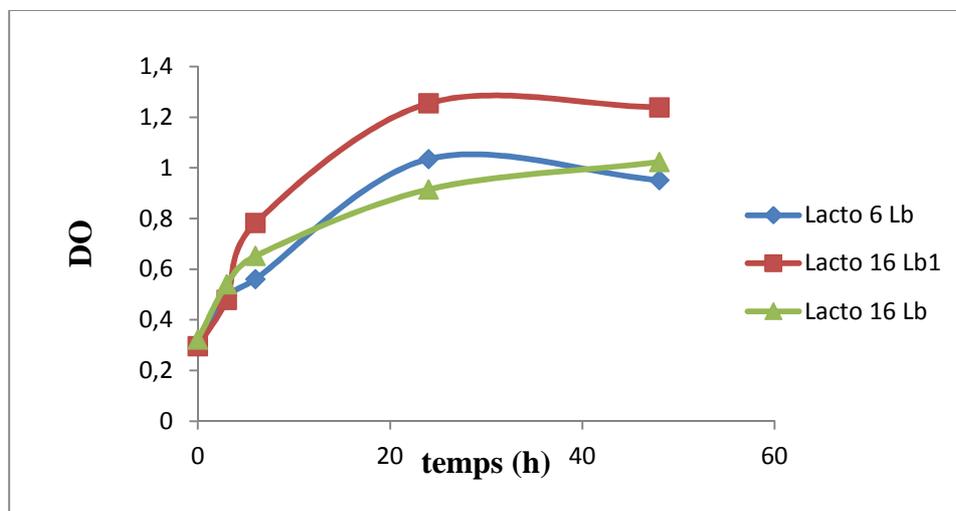
Souches	pH=3	pH=6,5
<i>Ln 6 Lb</i>	++	+++
<i>Lacto 9 Br</i>	++	+++
<i>Lacto 16 Lb</i>	++	+++
<i>Lacto 8 Lb</i>	++	+++
<i>Ln 18 Br</i>	++	+++
<i>Ln 7 Br</i>	++	+++
<i>Ln 15 Br</i>	++	+++
<i>Ln 3 Lb</i>	++	+++
<i>Lacto 7 Br</i>	++	+++
<i>Lacto 10 Lb</i>	++	+++
<i>Lacto 16 Lb1</i>	++	+++
<i>Lacto 13 Br</i>	++	+++
<i>Lacto 12 Lb</i>	++	+++
<i>Ln 12 Lb</i>	++	+++
<i>Lacto 3 Br</i>	++	+++

4- Cinétique de croissance et d'acidification en culture pure sur bouillon MRS :

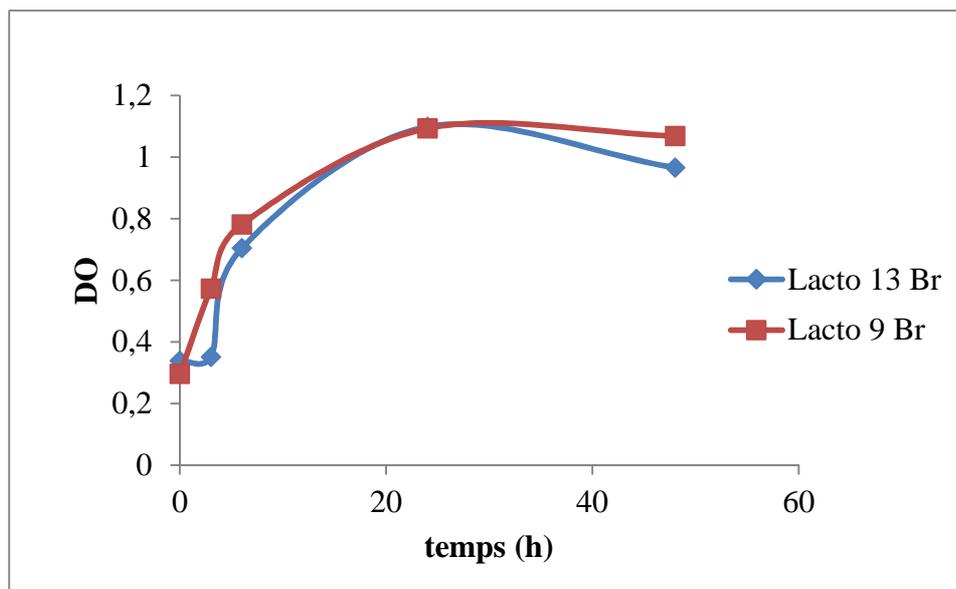
4.1- Cinétique de croissance :

Les caractéristiques de la croissance de quinze souches de bactéries lactiques sont évoluées à 30 °C dans le bouillon MRS par la mesure de l'évolution de l'absorbance à 620 nm.

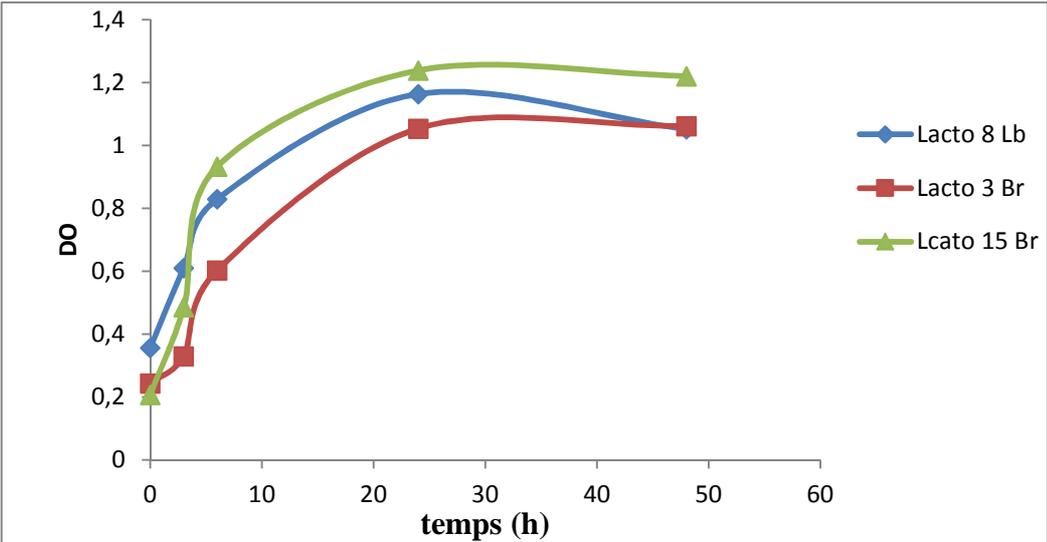
Les résultats obtenus sont représentés dans la figures 7, courbes (a, b, c, d, e).



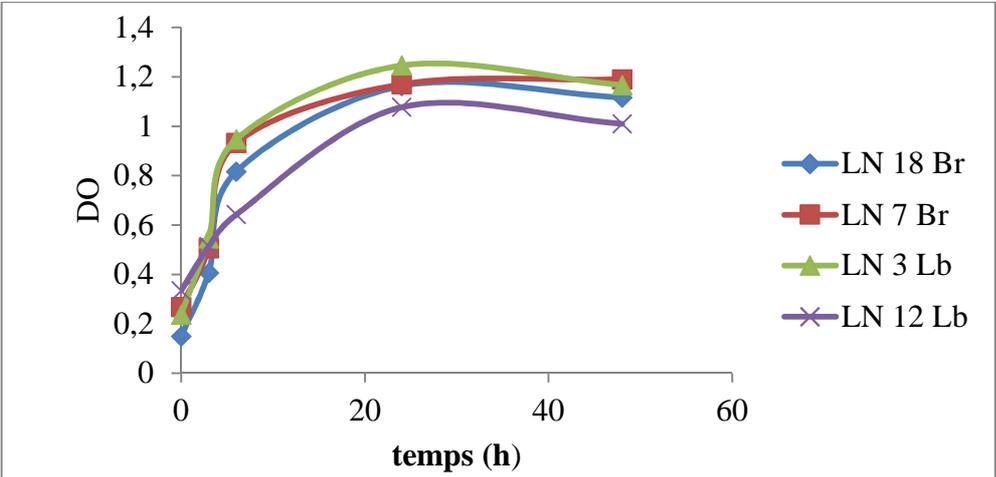
(a)



(b)



(c)



(d)

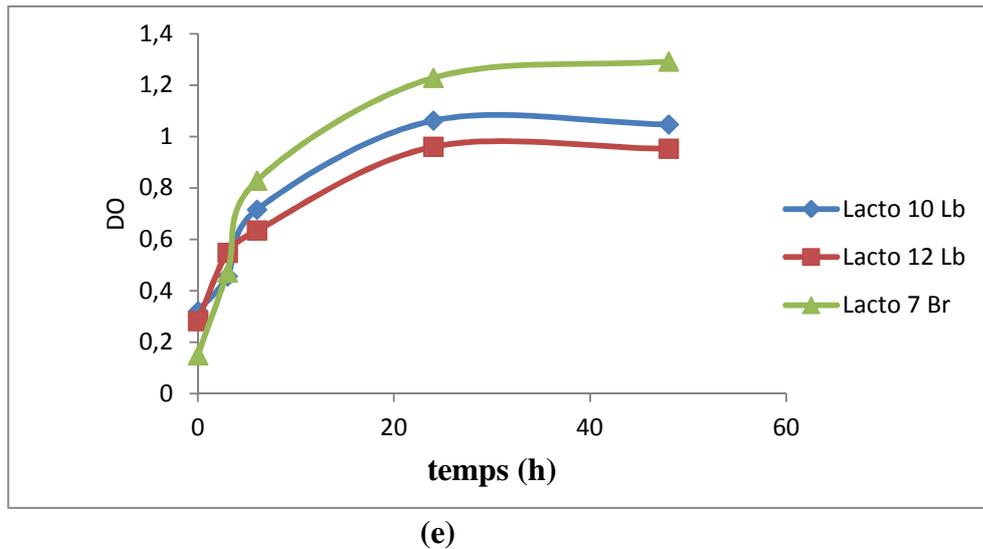


Figure (7) : cinétique de croissance de quinze souches de bactéries lactiques sur bouillon MRS

Les souches de bactéries lactiques présentent des courbes de croissance similaires pendant la période d'étude.

Les quinze souches étudiées ne présentent pas de phase de latence, ce qui signifie qu'elles se sont adaptées directement au milieu vu qu'on les a repiquées à partir du bouillon MRS.

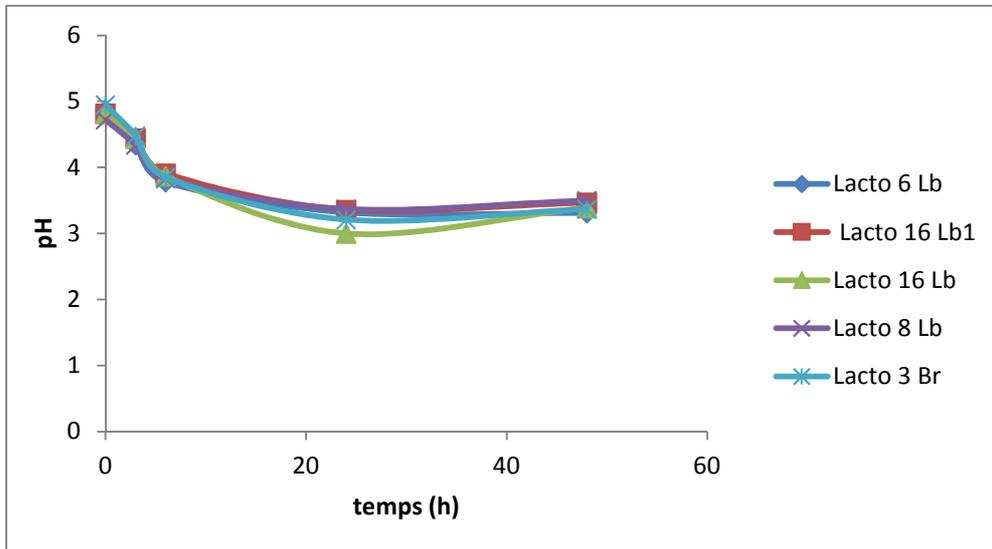
Les bactéries : Lacto 16 Lb 1, Ln 3 Lb, Lacto 15 Br, Lacto 7 Br, Lacto 8 Lb, Ln 18 Br, Lacto 13 Br et Lacto 9BRr, évoluent plus rapidement que les autres souches, les valeurs de la DO sont respectivement 1.255, 1.239, 1.228, 1.164, 1.163, 1.298 et 1.093. Ces souches sont citées par ordre décroissant de croissance.

Après 24 h d'incubation, toutes les souches se caractérisent par une phase de déclin. Cette phase correspond à la lyse des bactéries due au manque de réserve énergétique ou à l'accumulation de l'acide lactique. À l'exception de *Lacto 16 Lb, Lacto 7 Br et Lacto 3 Br* qui continuent de croître. La souche *Lacto 16 Lb* évolue plus rapidement que les deux autres souches. La valeur de sa DO varie entre 0,915 et 1,023.

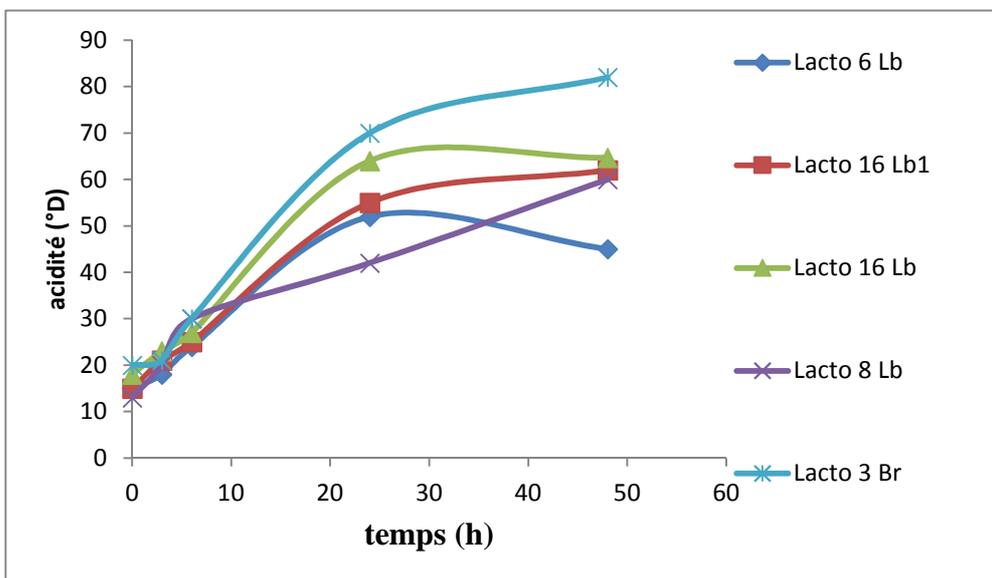
Les valeurs de densité optique obtenues se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs tels que **Sboui et al (2009)**. (Densité=1,02+/-0,0032), **Siboukeur(2007)** (Densité=1,0230=0,0045). D'autres auteurs avancent des valeurs plus élevées tel que **Kamoun, (1995)** (Densité= 1,028+/-0,002), **(Farah, 1993)**.

4.2- Cinétique d'acidification sur bouillon MRS en culture pure :

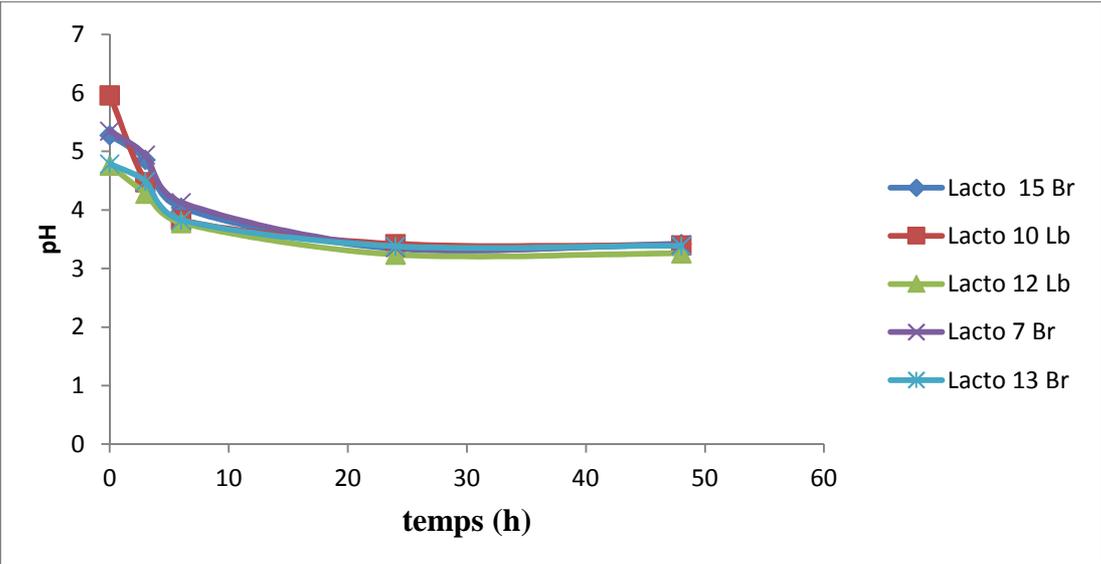
Le suivi sur bouillon MRS (pH et acide lactique) pendant 48h d'incubation à 30 °C pour les quinze souches, nous a permis de tracer la figure 8, courbes (a, b, c, d, e, f).



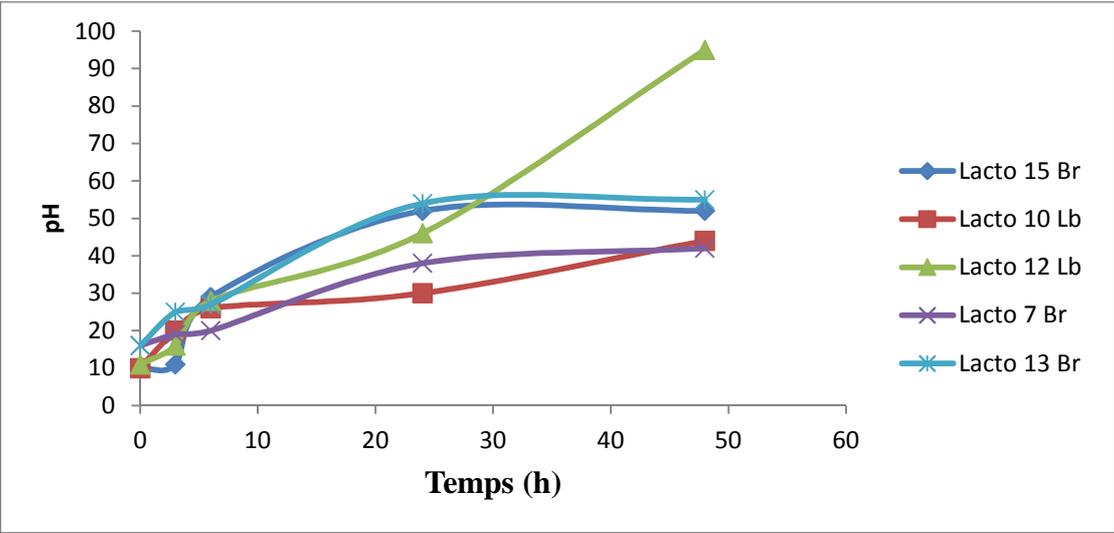
(a)



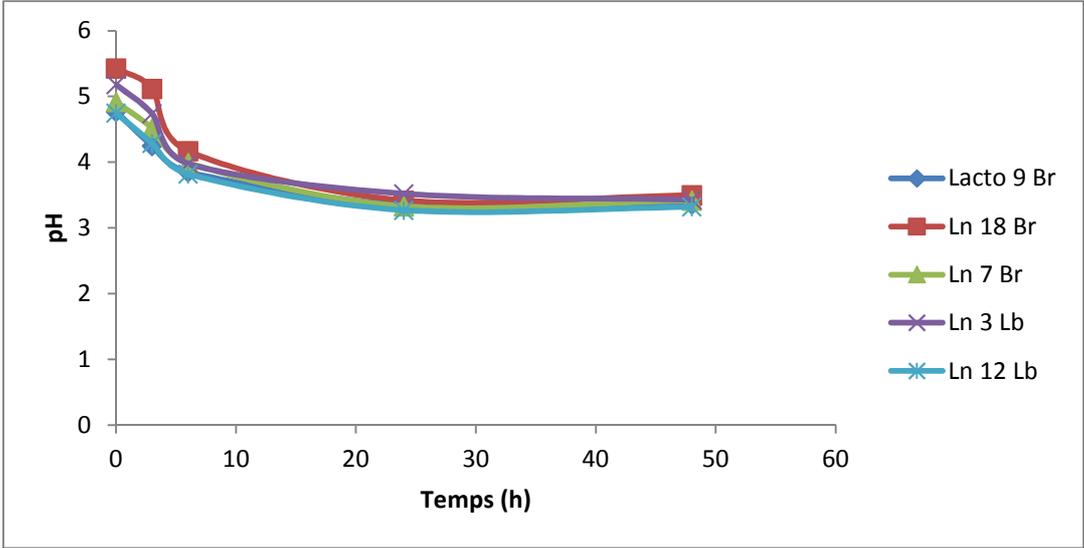
(b)



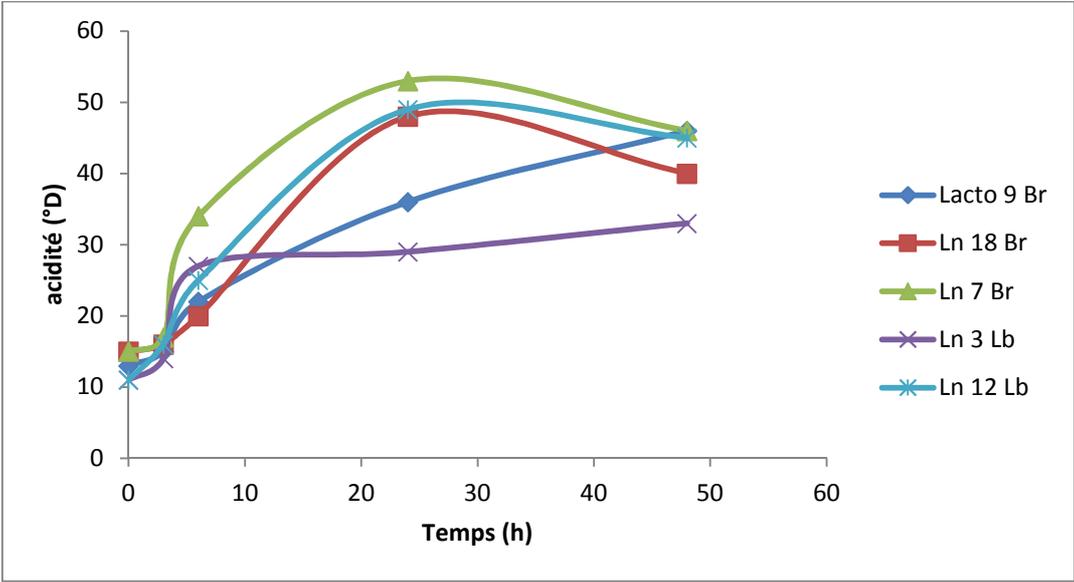
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 8 : Evolution du pH et de l'acidité des quinze souches de bactéries lactiques.

La diminution du pH pendant les six premières heures montre une production d'acides lactique (courbes a, b, c, d, e et f) pour toutes les souches. Cette activité ralentie ensuite après 24 h.

Selon **Amran et Prigent (1998)**, la diminution du pH, lors de la culture libre se combine à l'accumulation de l'acide lactique et conduit à une forte inhibition de la croissance et du métabolisme bactérien.

Les souches de bactéries lactiques qui présentent une croissance importante sur bouillon MRS s'accompagnent d'une forte baisse de pH.

- En résumant l'effet du pH et de l'acide lactique sur la croissance et la production d'acide lactique par les résultats conclus par **Amran et Prigent (1999)** :

Au début de la fermentation, le pH constitue le seul facteur qui contrôle la croissance et la production d'acide lactique. À la fin de la croissance, durant la phase de déclin, l'inhibition se fait uniquement par la concentration d'acide lactique non dissocié et le pH n'a qu'un effet indirect.

5- Variation de pH et de la capacité maximale d'acidification lors de la fermentation sur bouillon MRS :

Dans cette étude, deux paramètres ont été étudiés, la variation de pH (ΔpH) et la capacité maximale d'acidification (C_m), dans le but est de comparer entre les quinze souches. Les résultats sont représentés dans les figures 9 et 10.



Figure 9: Représentation graphique de mesure ΔpH de différentes souches de bactéries lactiques

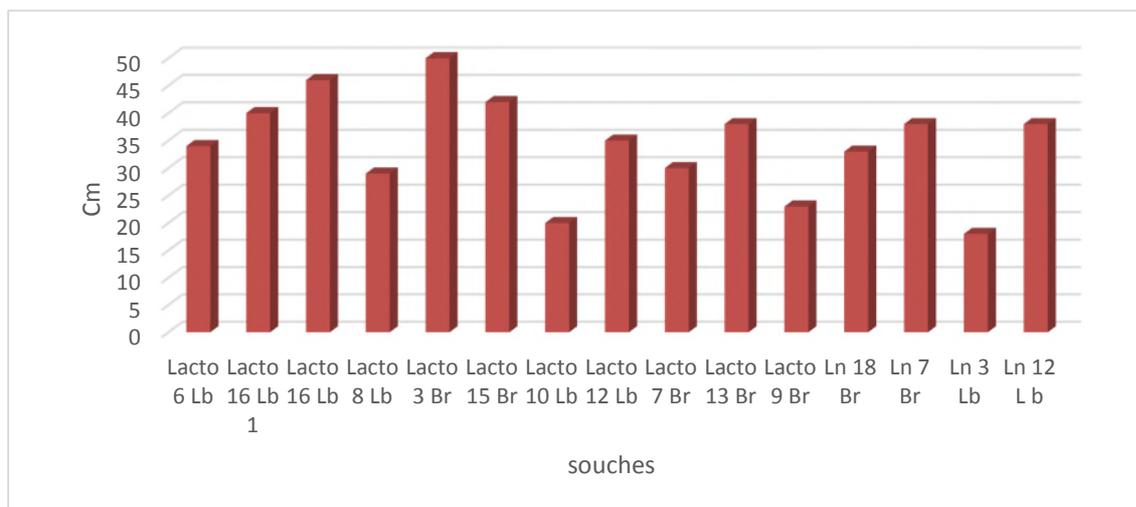


Figure 10 : Représentation graphique de mesure de C_m de différentes souches de bactéries lactiques.

Après 24 h de croissance des différentes souches de bactéries lactiques sur bouillon MRS à 30°C, les souches *Lacto 13 Br* et *Lacto 10 Lb* présentent les valeurs minimales et maximales de ΔpH qui sont respectivement 1,41 et 2,54.

La variation de pH diffère d'une souche de bactérie lactique à une autre et la comparaison entre elles se fait par rapport au ΔpH moyenne qui est de 1,67.

Lacto 3 Br, *Lacto 15 Br*, *Lacto 10 Lb*, *Lacto 7Br*, *Ln 18Br* présentent une forte ΔpH ($\Delta\text{pH} > 1,67$), tandis que les autres souches ont un faible ΔpH ($\Delta\text{pH} < 1,67$).

Les valeurs minimales et maximales de C_m au bout de 24 H sont respectivement 18 et 50°D et appartiennent aux deux souches *Ln 3 Lb* et *Lacto 3 Br*.

La capacité d'acidification moyenne est de 34,29 °D.

Lacto 10Lb et *Ln 3Lb* présentent une faible C_m ($C_m < 34,29$ °D), tandis que les autres souches ont une forte C_m ($C_m > 34,29$ °D).

- Les résultats obtenus de la comparaison des souches en fonction des paramètres C_m et ΔpH ont montrés que les souches présentant une forte ΔpH ($\Delta\text{pH} > 1,67$) sont accompagnées d'une forte C_m ($C_m > 34,29$ °D) ce qui concorde avec les résultats de **Sina (1992)**, à l'exception de *Lacto 10 Lb* qui présente une faible capacité d'acidification d'une valeur de 20°D (soit $C_m < 34,29$ °D). Les souches à faible ΔpH s'accompagnent aussi d'une forte C_m , à l'expression près de *Ln 3lb* qui présente une faible capacité d'acidification d'une valeur de 18 °D (soit $C_m < 34,29$ °D).

-Ces résultats indiquent que la production d'acide lactique et la baisse de pH ne sont pas toujours proportionnelles (**Abutarbousch, 1996 ; Tourette et al., 2001**).

6 – Etude de la vitesse d'acidification des bactéries lactiques en culture pure à partir de la variation de pH lors de la fermentation :

La variation du pH de la fermentation du bouillon MRS par les souches fortement acidifiantes (*Lacto 16 Lb*, *Lacto 3 Br*, *Lacto 15 Br*, *Lacto 7 Br* et *Ln 18 Br*) a été étudié pendant les 6 premières heures (figure 11) afin de sélectionner la ou les souches à grande vitesse d'acidification.

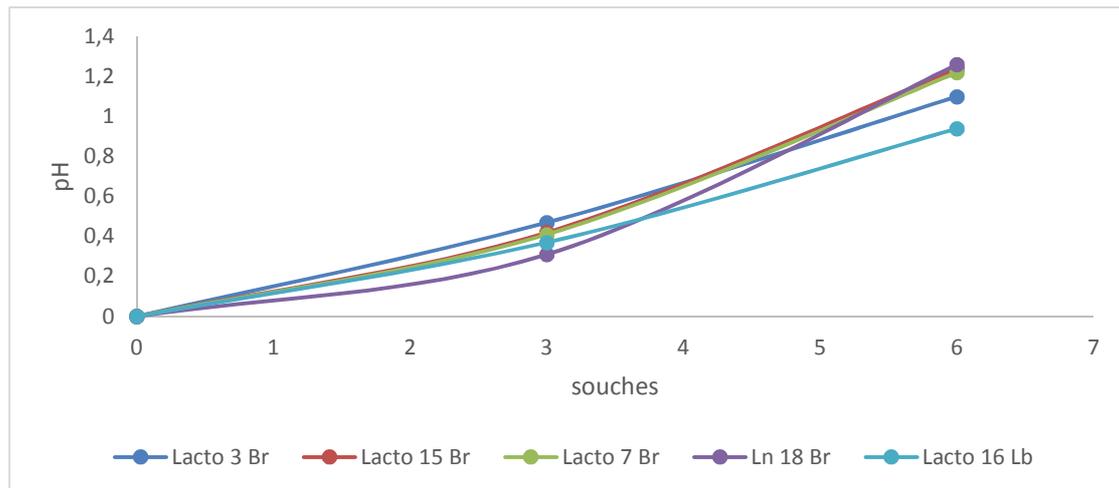


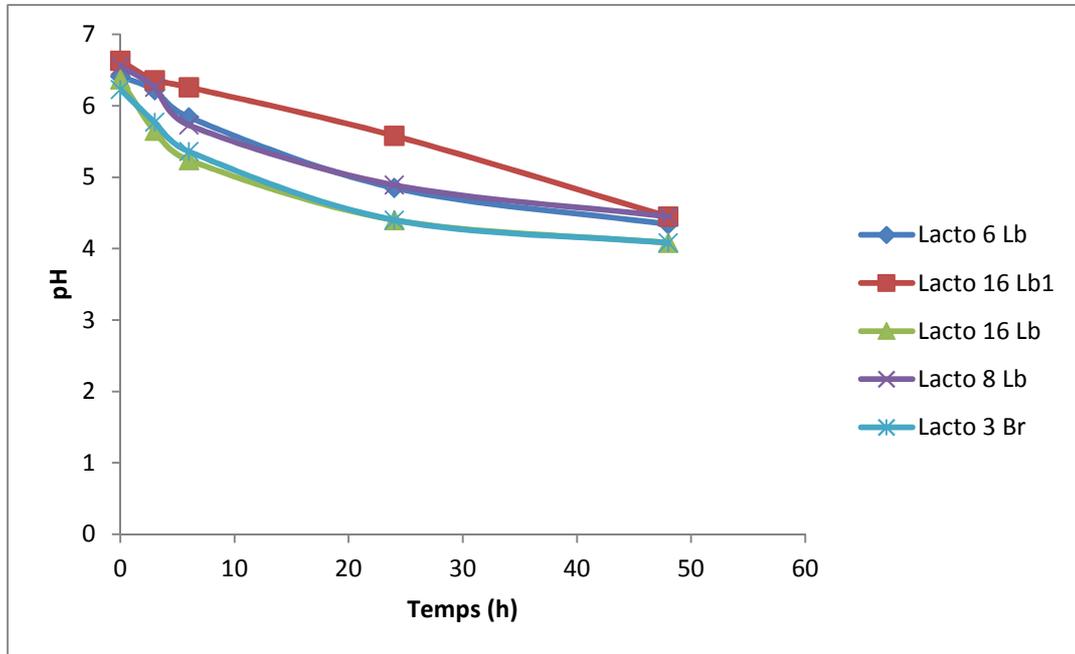
Figure 11 : Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures des 4 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques sur bouillon MRS.

La détermination de la variation de pH (ΔpH) permet de classer les bactéries lactiques acidifiantes en fonction de leur vitesse d'acidification pendant les 6 premières heures, ainsi les souches sont qualifiées de : souches à grande vitesse d'acidification si la variation de pH atteint une valeur de 0,4 unité de pH en moins de 3h ; souches à vitesse moyenne d'acidification si cette valeur est atteinte entre 3 et 5h ; souches à faible vitesse d'acidification si la valeur est atteinte après 5 h. (Aribas et al., 2009).

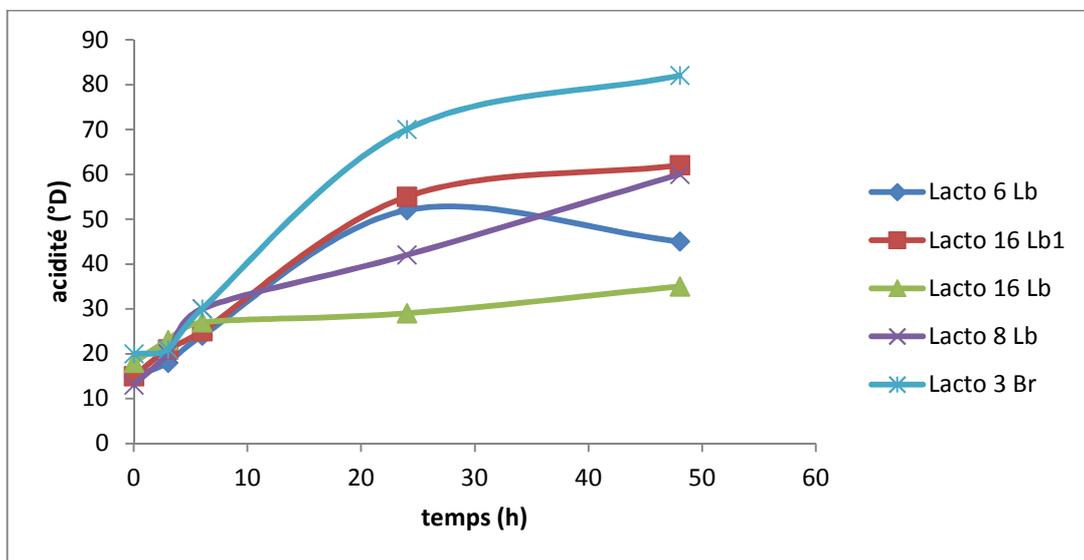
En projetant la valeur de 0,4 unité pH sur les courbes de variation puis sur l'axe des abscisses (temps) (figure 11), nous remarquons que les souches *Lacto 3 Br*, *Lacto 15 Br* et *Lacto 7 Br* ont diminué le pH du bouillon MRS de 0,4 unité pH en moins de trois heures ; ce sont donc des souches à grande vitesse d'acidification. De plus, la vitesse d'acidification de la souche *Lacto 3 Br* est supérieure à celle de la souche *Lacto 15 Br* qui est aussi supérieure à celle de la souche *Lacto 7 Br* de *Ln 18 Br* qui a diminué le pH du bouillon MRS de 0,4 unité pH pour $3 < t \leq 5$ heures. Donc cette souche a une vitesse moyenne d'acidification.

7- Cinétique d'acidification des souches de bactéries lactiques dans le lait :

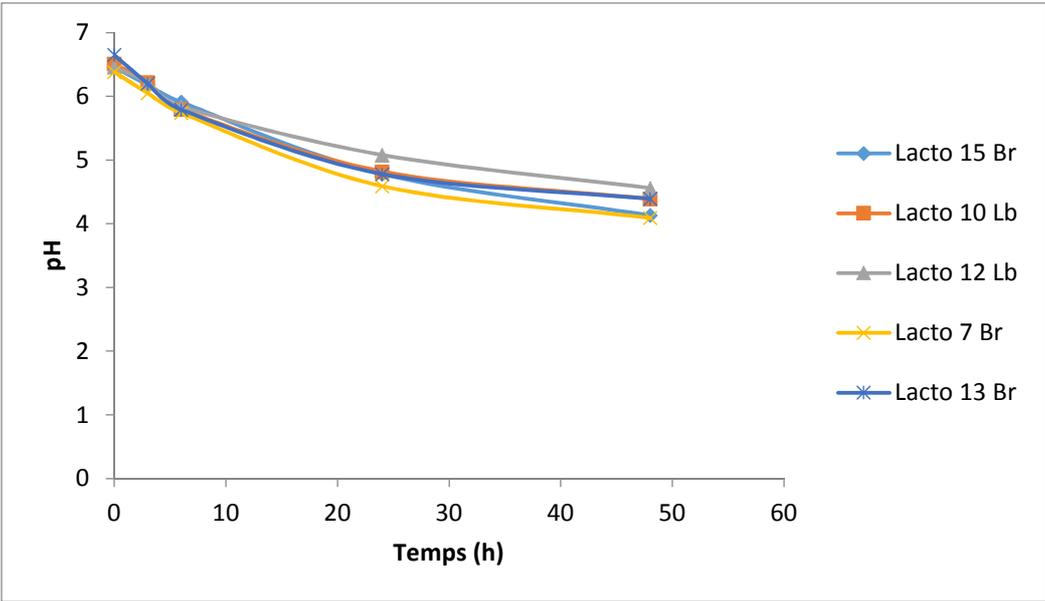
La figures 12 (a, b, c, d, e, f) représente le suivi dans le lait (pH et acide lactique) pendant 48h d'incubation à 30 °C pour les quinze souches de bactéries lactiques.



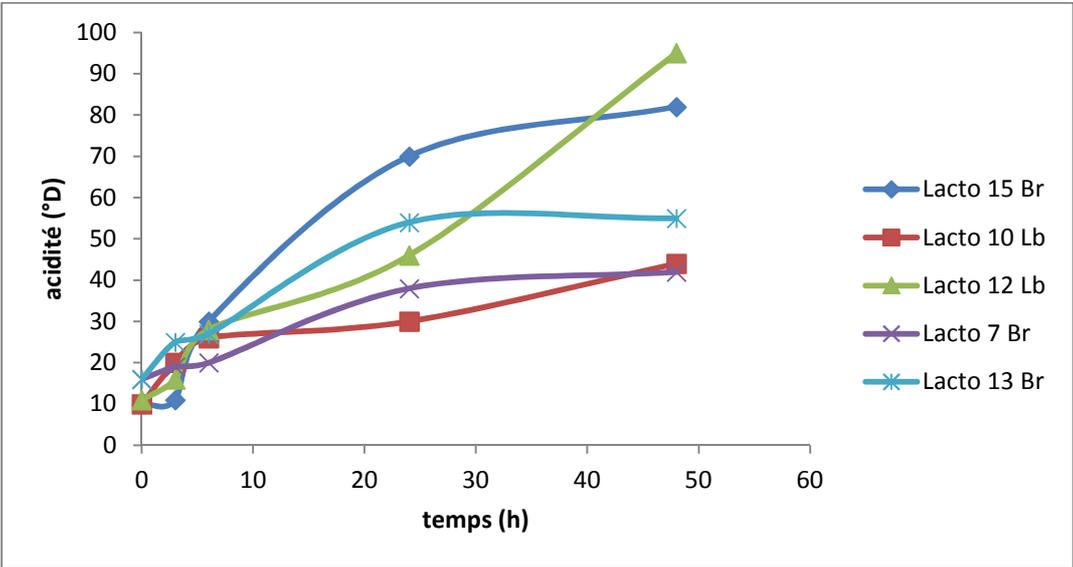
(a)



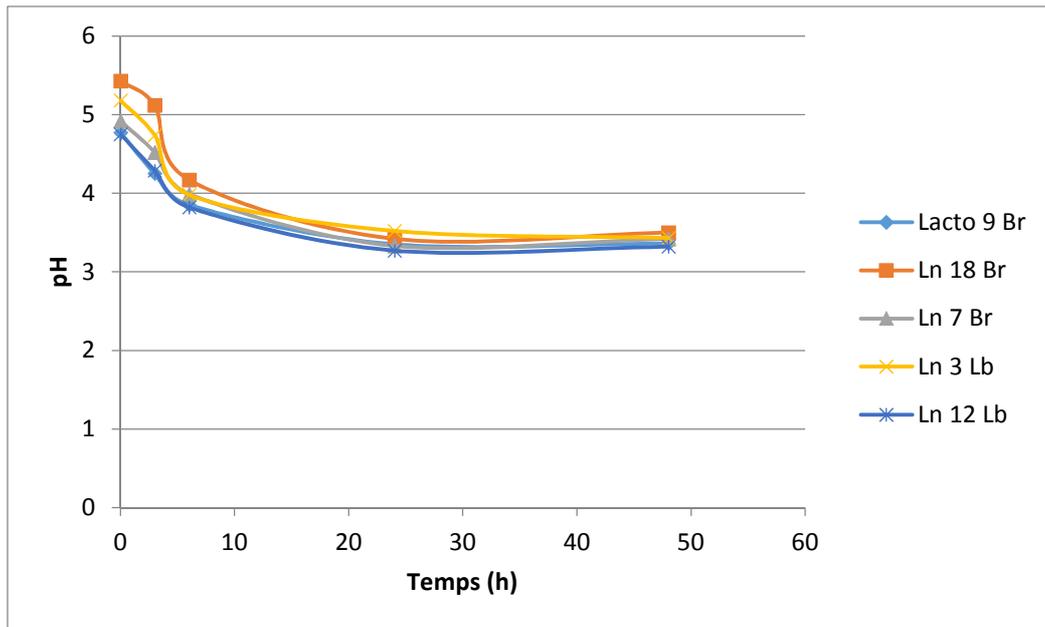
(b)



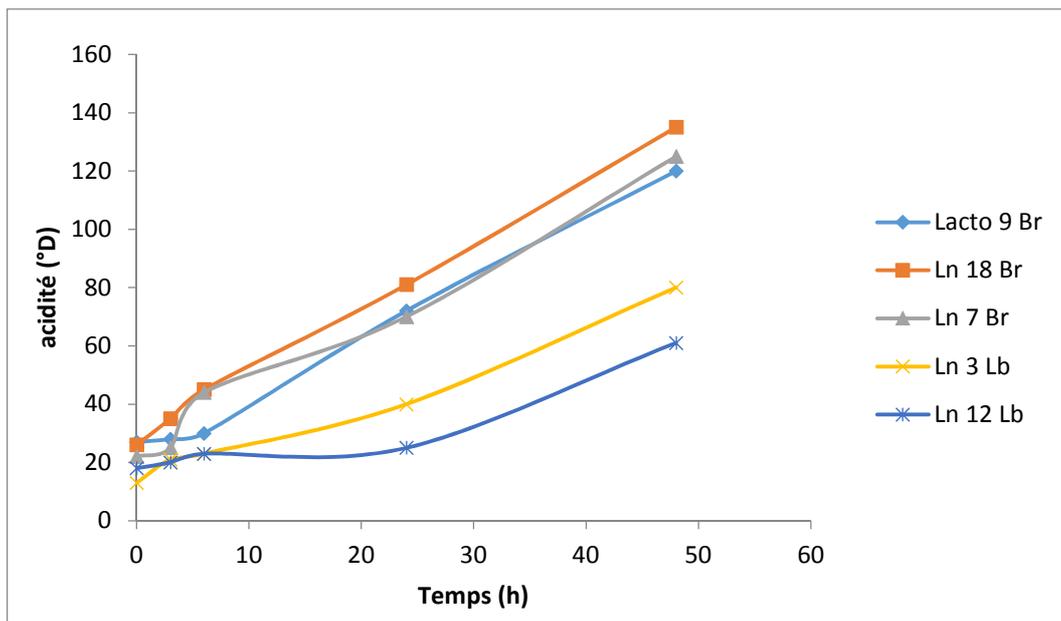
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 12 : Evolution du pH et de l'acidité de quinze souches de bactéries lactiques.

La baisse du pH du lait pendant les six premières heures (courbes a, b, c, d, e et f) s'accompagne également d'une augmentation de production d'acides lactique pour toutes les souches. Cette activité ralentie ensuite après 24 h.

L'acidité titrable du lait dépend du nombre de moles d'acide lactique présents dans ce produit et elle est inversement proportionnelle à son pH (**Mathieu, 1998**) ; (**Sina 1992**). Ce qui concorde avec les résultats obtenus.

Le lait acquiert ensuite une acidité, dite acidité développée car elle est provoquée par l'acide lactique et d'autres acides issus de l'activité fermentaire des microorganismes (**Badaoui, 2000**).

Le lait normal présente une acidité de 14 à 17 °D. Les laits acides coagulent au chauffage à partir de 25° D ou à température ordinaire à 70 °D (**Larpen, 1997**). Ce qui concorde avec nos résultats car l'échantillon de lait à une valeur de 17 °D et les laitsensemencés avec les différentes souches de bactéries lactiques ont, pour la plupart fortement coagulé le lait. *Lacto 16 Lb1 et Lacto 8 Lb* l'ont coagulé moyennement, tandis que *Ln 3 Lb* et *Ln 12 Lb* présentent une faible coagulation (**Annexe VII**).

8 - Variation de pH et de la capacité maximale d'acidification lors de la fermentation dans le lait :

Les résultats de la variation de pH (ΔpH) et de la capacité maximale d'acidification (C_m) sont représentés dans les figures 13 et 14.

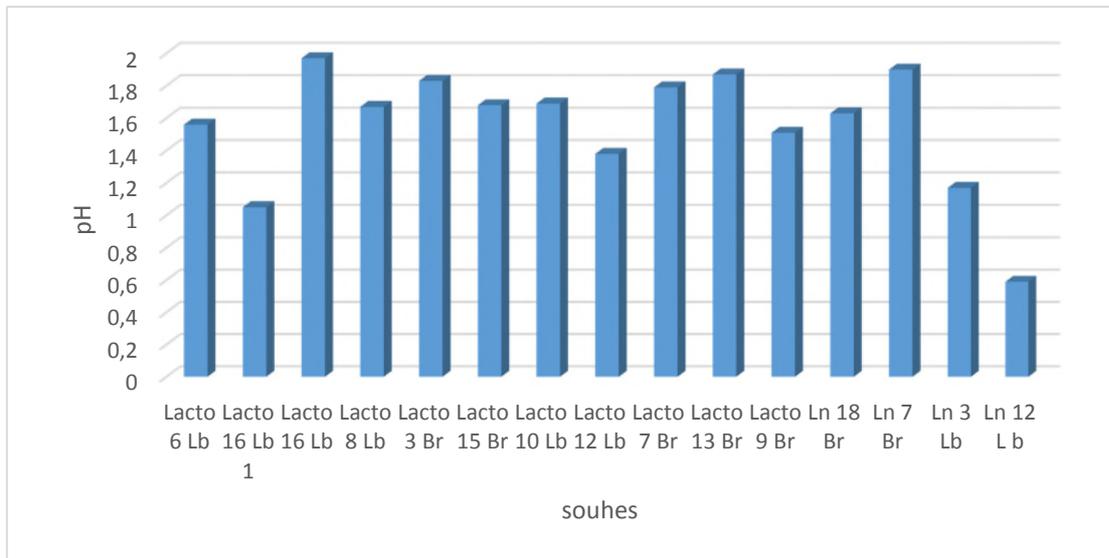


Figure 13 : Représentation graphique de mesure de ΔpH de différentes souches de bactéries lactiques

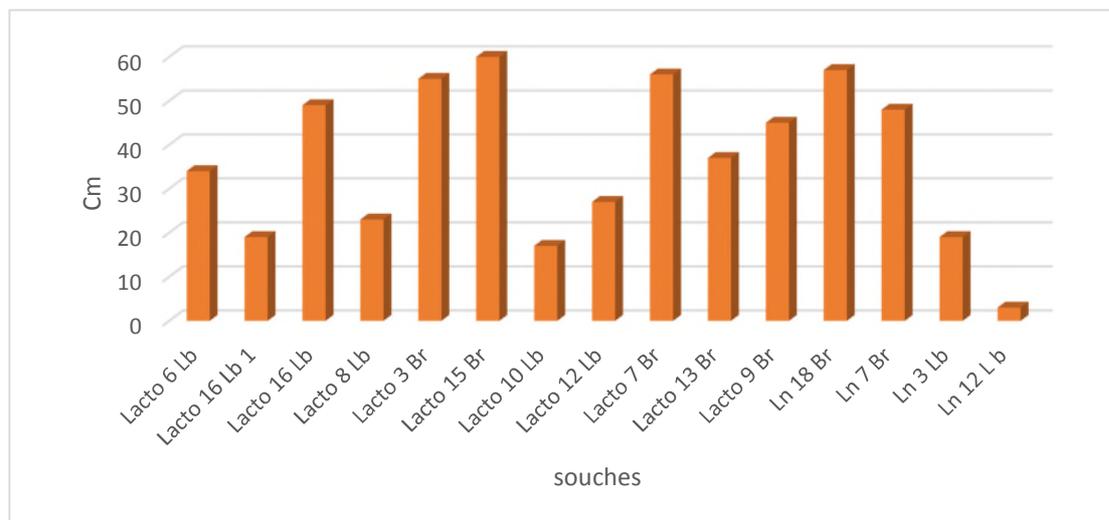


Figure 14 : Représentation graphique de mesure de C_m de différentes souches de bactéries lactiques.

Après 24h de croissance des différentes souches de bactéries lactiques sur le lait à 30 °C, les valeurs minimales et maximales de ΔpH sont respectivement 0,59 et 1,97 qui appartiennent aux deux souches Ln 12 Lb et Lacto 16 Lb.

Lacto 16 Lb1, *Lacto12 LB*, *Lacto 9 Br*, *Ln 3 Lb* et *Ln 12 Lb* présentent un faible ΔpH ($\Delta\text{pH}<1,55$), tandis que les autres souches ont un fort ΔpH .

Il est connu qu'à des pH bas, l'acide lactique provoque une pression dans les cellules microbiennes (Vali et al., 2006) puis les bactéries perdent leurs activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de β galactosidase et d'autres enzymes de la glycolyse.

Après 24h d'acidification dans le lait à 30°C, Les valeurs minimales et maximales de C_m sont respectivement de 3 et 60°D et la valeur de C_m moyen est de 36,6 °D.

Lacto 6 Lb, *Lacto 16 Lb1*, *Lacto 8 Lb*, *Lacto 10 Lb*, *Lacto 12 Lb*, *Ln 3 Lb* et *Ln 12 Lb* présentent une faible C_m ($C_m < 36,6$), tandis que les autres souches ont une forte C_m .

- Les résultats obtenus de la comparaison des souches en fonction des paramètres C_m et ΔpH ont montrés que les souches présentant un fort ΔpH ($\Delta\text{pH} > 1,55$) sont accompagnées d'une forte C_m ($C_m > 36,6$), à l'exception de *Lacto 10 Lb*, *Lacto 6Lb* et *Lacto 8Lb* qui présentent une faible capacité d'acidification de valeurs respectives de 17, 34 et 23 °D (soit $C_m < 36,6$ °D), et que les souches à faible ΔpH s'accompagnent d'une faible C_m , à l'exception près de *Lacto 9Br* qui présente une forte capacité d'acidification d'une valeur de 45 °D (soit $C_m > 36,6$ °D).

Selon Abutarbousch (1996) et Tourette et al (2001), l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité dornic des inocula de quelques souches s'explique par rapport à l'effet du tampon qui est relativement élevé et qui s'oppose au changement brusque du pH lors d'une augmentation de l'acidité dornic.

9- Etude de la vitesse d'acidification des souches de bactéries lactiques en culture pure à partir de la variation de pH lors de la fermentation :

La variation du pH de la fermentation du lait par les souches fortement acidifiantes (de *Lacto 16 Lb* jusqu'à *Ln 7 Br*) a été étudié pendant les 6 premières heures (figure 15 et 16) afin de sélectionner la ou les souches à grande vitesse d'acidification.

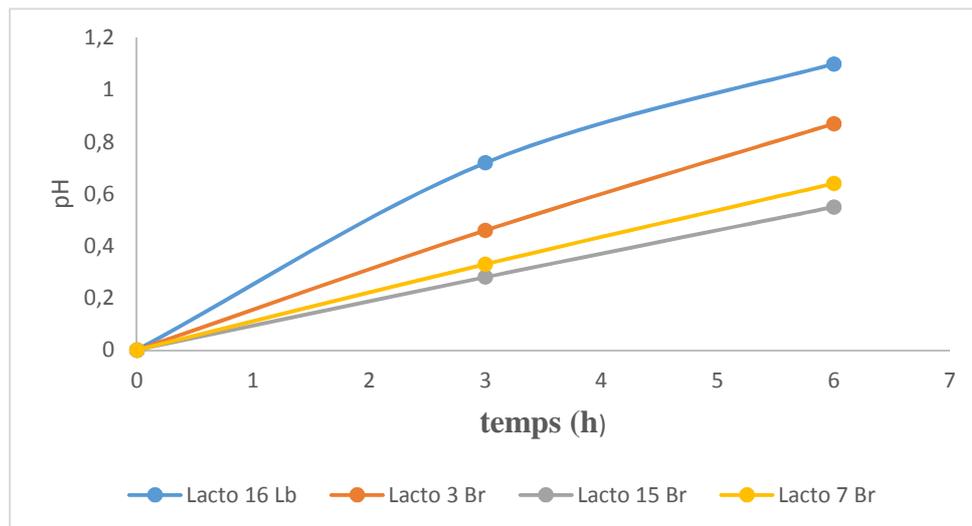


Figure 15 : Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures de 4 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques dans le lait.

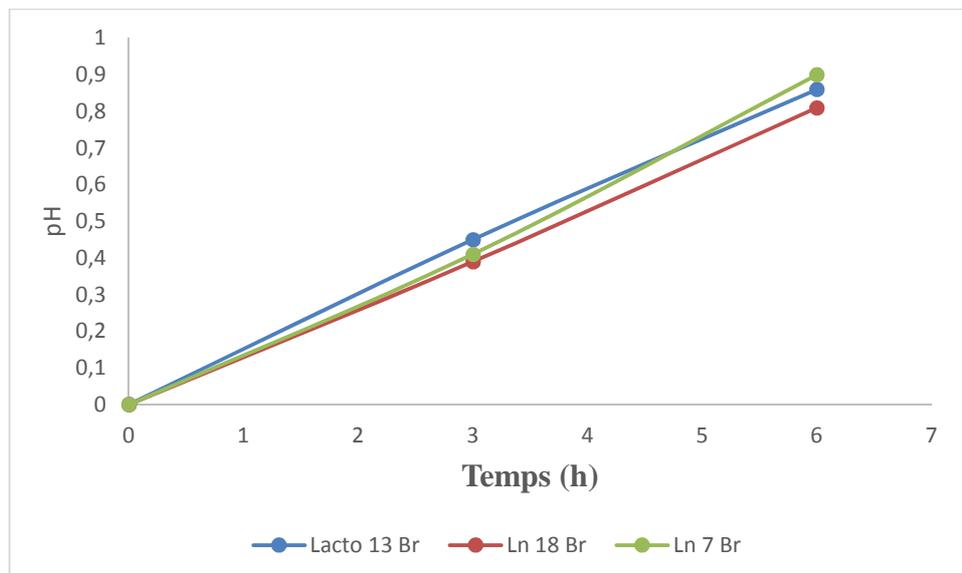


Figure 16: Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures de 3 souches les plus acidifiantes de bactéries lactiques dans le lait.

En projetant la valeur de 0,4 unité pH sur les courbes de variation puis sur l'axe des abscisses (temps), nous remarquons que : Les souches *Lacto 16 Lb*, *Lacto 3 Br*, *Lacto 13 Br* et *Ln 7 Br* ont diminué le pH du lait de 0,4 unité pH en moins de trois heures; ce sont donc des souches à grande vitesse d'acidification.

De plus, la vitesse d'acidification de la souche *Lacto 16 Lb* est supérieure à celle de la souche *Lacto 3 Br* qui est aussi supérieure à celle de la souche *Lacto 13 Br* qui est aussi plus grande que celle de *Ln 7 Br*.

Les souches *Lacto 15 Br*, *Lacto 7 Br* et *Ln 18 Br*. ont diminué le pH du lait de 0,4 unité pH pour $3 < t \leq 5$ heures. Ces souches ont une vitesse moyenne d'acidification du lait. De plus la vitesse d'acidification de la souche *Ln 18 Br* est plus grande que celle de *Lacto 7 Br* qui est aussi plus grande que celle de *Lacto 15 Br*.

Les résultats de **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. À cet égard on peut confirmer que les souches *Lacto 16 Lb*, *Lacto 3 Br.*, *lacto 13 br* et *Ln 7 Br* sont fortement acidifiante.

10- Cinétique d'acidification dans le lait en culture mixte :

Le suivi dans le lait du pH et acidité Dornic pendant 48h d'incubation à 30 °C pour les souches en culture mixte nous a permis de tracer les courbes 17 et 18 :

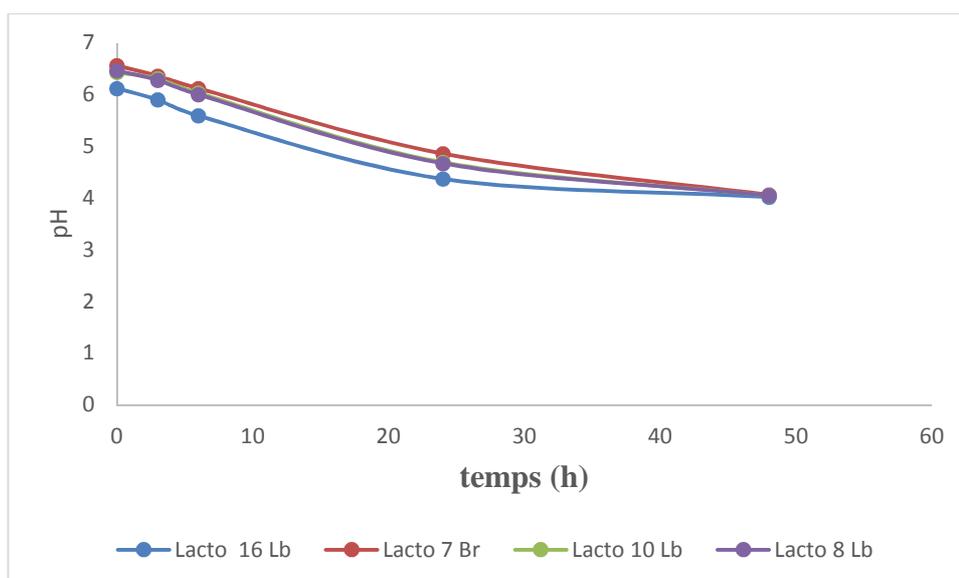


Figure 17 : Evolution du pH des souches en culture mixte dans le lait.

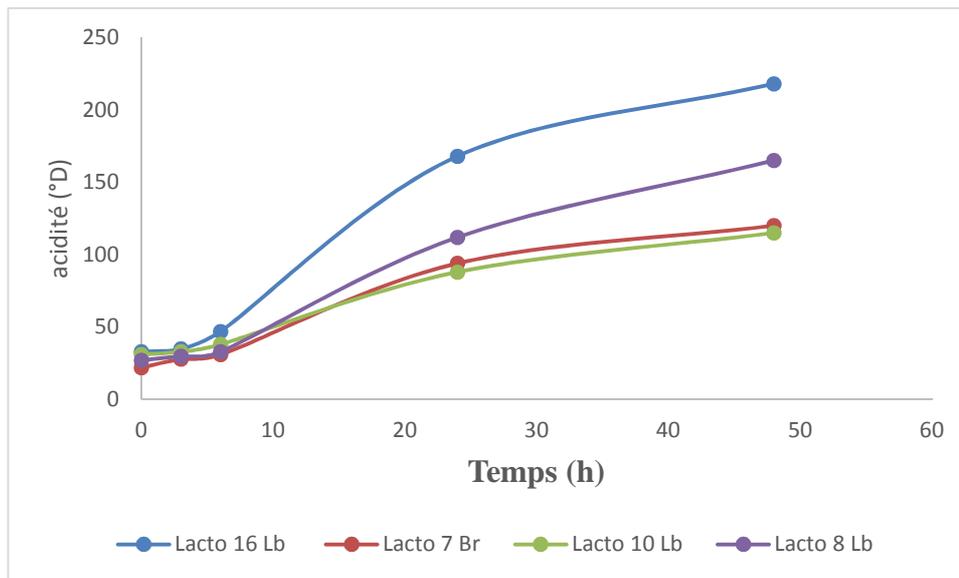


Figure 18 : Evolution de l'acidité des souches en culture mixte dans le lait.

Concernant les cultures mixtes étudiées, la diminution du pH du lait est plus rapide pour la combinaison (*Ln 18 Br*, *Lacto 10 Lb*) et pour (*Lacto 18 br*, *Ln 8 Lb*) (figure 17) en comparaison avec la culture pure.

La production d'acide par les cultures mixtes pour toutes les souches est nettement supérieures à celles des cultures pures, les résultats obtenues avec des cultures mixtes (figure 18) révèle une stimulation de la production d'acide lactique.

Les associations (*Lacto 8 Lb*, *Ln 18 Br*) et (*Lacto 10 Lb*, *Ln 18 Br*) présentent une acidité Dornic plus élevée que dans le cas où ces souches sont ensemencées en culture pures. L'amélioration de l'activité acidifiante est plus marquée pour la culture mixte où sont associées les souches (*Lacto 16 Lb*, *Ln 18 Br*). En culture pure, la souche *Ln 18 Br* présente une acidité moyenne.

L'association des souches de bactéries lactiques étudiées, en proportion identique, entraîne une amélioration du pouvoir acidifiant ; ceci indique l'existence d'une interaction entre les souches, une relation de symbiose qui se déroule en activant leur pouvoir fermentaire (Ngounou et al., 2003).

11- Variation de pH et de la capacité maximale d'acidification en culture mixte lors de la fermentation dans le lait :

Les résultats de la variation de pH (ΔpH) et de la capacité maximale d'acidification (C_m) en culture mixte sont représentés dans les figures 19 et 20.

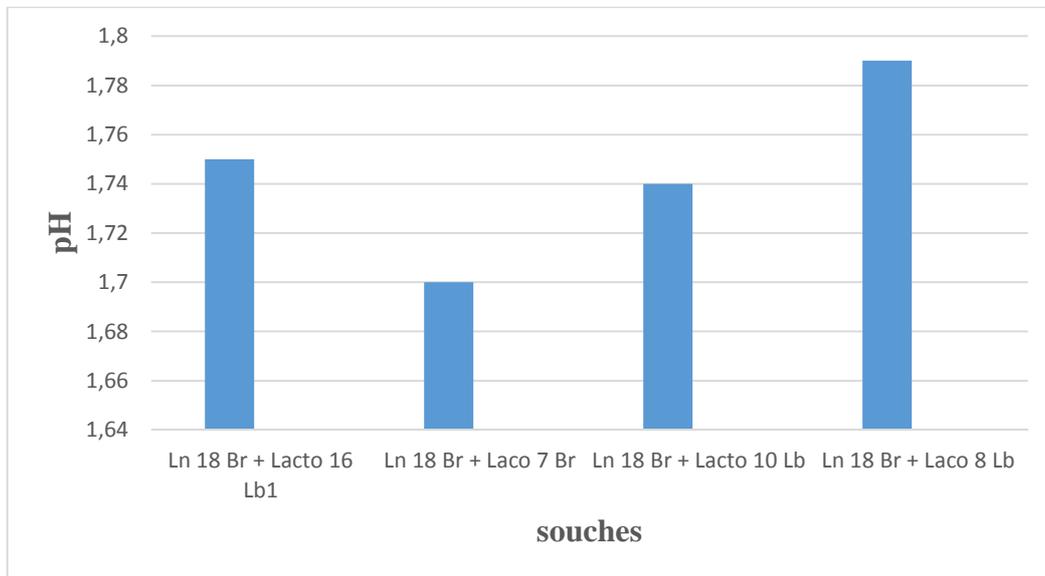


Figure 19: Représentation graphique de mesure de ΔpH de différentes souches de bactéries lactiques en culture mixte.

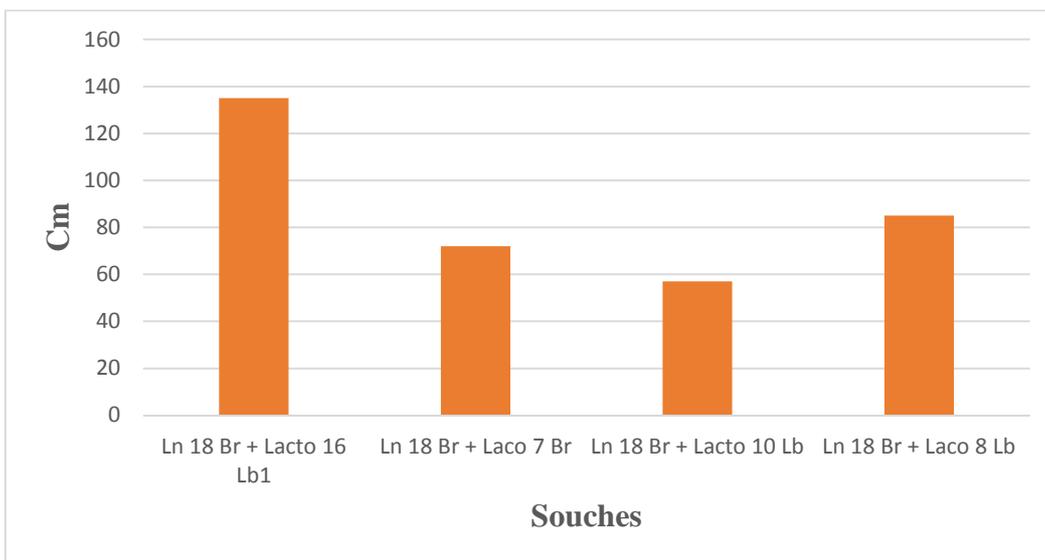


Figure 20: Représentation graphique de mesure de C_m de différentes souches de bactéries lactiques en culture mixte.

Après 24h d'incubation, dans le lait à 30°C, les valeurs minimales et maximales de ΔpH sont respectivement 1,7 et 1,79 sont révélées chez les combinaisons (*Ln 18 Br, Laco 7 Br*) et (*Ln 18 Br, Laco 8 Lb*) et la valeur du ΔpH moyen est de 1,74.

L'association des souches : (*Ln 18 Br, Lacto 16Lb*), (*Ln 18 Br, Lacto 10 Lb*), et (*Ln 18 Br, Lacto 8 Lb*) présentent $\Delta\text{pH} > 1.74$, tandis que l'association que l'association (*Ln 18 Br, Lacto 7 Br*) a un $\Delta\text{pH} < 1.74$.

Les souches Lacto 16 Lb et Lacto 7 Br diminuent le pH du lait mieux en culture pure qu'en culture mixte car ce sont des souches fortement acidifiantes qui se sont associées avec une souche moyennement acidifiante (*Ln 18 Br*). Contrairement aux souches *Lacto 8Lb* et *Lacto 10 Lb* qui diminuent le pH mieux en culture mixte qu'en culture pure.

Les valeurs minimales et maximales de C_m sont respectivement de 57 et 135 °D et la valeur de C_m moyen est de 87,25 °D.

L'interaction entre les souches (*Ln 18 Br + 16 Lb*), (*Ln 18 Br + Lacto 7 Br*) et (*Ln 18 Br + lacto 8 Lb*) présentent une forte C_m tandis que l'interaction entre *Ln 18 Br* et *Lacto 10 Lb* présente une faible C_m ($C_m < 87,25$).

- Les résultats obtenus de la comparaison des souches en fonction des paramètres C_m et ΔpH ont montrés que l'association des souches présentant un fort ΔpH ($\Delta\text{pH} > 1,74$) est accompagnée d'une forte C_m à l'exception de l'association de *Ln 18 Br avec Lacto 10 Lb* qui a un faible C_m d'une valeur de 57 °D ($C_m < 87,27$ °D). L'association de *Ln 18 Br avec Lacto 7 Br* présente un faible ΔpH et une forte C_m de valeur de 98 °D (soit $C_m > 87,25$ °D).

12- Etude de la vitesse d'acidification des souches de bactéries lactiques en culture mixte à partir de la variation de pH lors de la fermentation :

La variation du pH de la fermentation du lait par les souches fortement acidifiantes (*Lacto 16 Lb*, *Lacto 7 Br* et *Lacto 8 Lb* et *Lacto 10 Lb*) a été étudié pendant les 6 premières heures (figure 21).

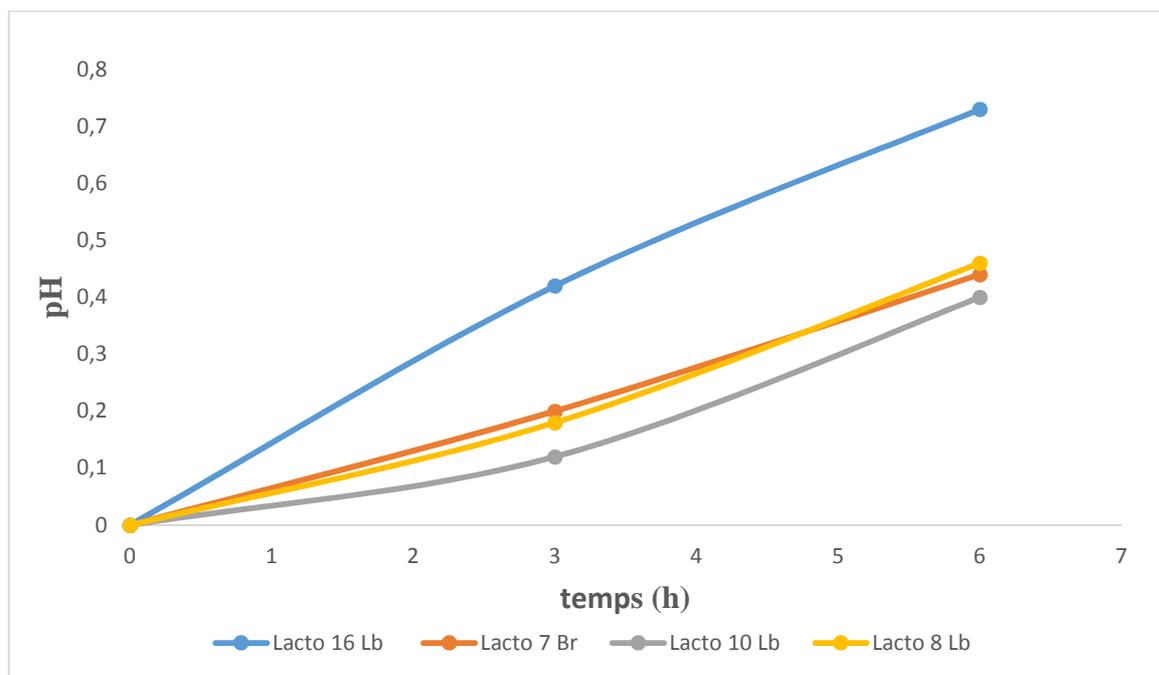


Figure 21: Evolution de la variation du pH durant les 6 premières heures des 4 souches en culture mixte dans le lait.

En projetant la valeur de 0,4 unité pH sur les courbes de variation puis sur l'axe des abscisses (temps) (figure 21), nous remarquons que l'association des souches *Ln 18 Br* avec *Lacto 16 Lb* a fait diminuer le pH dans le lait de 0,4 unité pH en moins de trois heures ; il s'agit donc d'une association à grande vitesse d'acidification. De plus, la vitesse d'acidification de l'association des souches *Ln 18 Br* avec *Lacto 7 Br* et l'association de *Ln 18 Br* avec *Ln 8 Lb* ont fait diminuer le pH du lait de 0,4 unité pH pour $3 < t \leq 6$ heures. Donc ce sont des souches à vitesse moyenne d'acidification. La vitesse d'acidification de l'association de *Ln 18 Br* avec *Lacto 10 Lb* diminue le pH dans le lait de 0,4 unité pH à partir de 6 H. Cette association a une lente vitesse d'acidification.

Les études de combinaisons des souches pour l'acidification nous ont permis de dégager une relation de coopération entre les souches de *Leuconostoc* et de *Lactobacillus*. En effet, en présence de *Leuconostoc*, la vitesse d'acidification du lait par les lactobacilles augmente de façon considérable (**Diks et al., 1995**) cela s'applique aux résultats obtenus par l'association des souches *Lacto 10 Lb* avec *Ln 18 Br* et *Lacto 8 Lb* avec *Ln 18 Br*.

Diks et al (1995), ont aussi démontré que certaines espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* sont en étroite relation cela s'applique également aux résultats qu'on a obtenus avec les combinaisons (*Lacto 16 Lb, Ln 18 Br*) et (*Lacto 7 Br, Ln 18 Br*).

Conclusion

Conclusion

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continue.

En ce qui concerne l'aptitude du lait de vache à l'acidification par les ferments lactiques, seuls quelques travaux anciens se sont attachés à comparer la croissance de bactéries lactiques dans des laits de vache de diverses origines.

Le but de cette étude était d'étudier le pouvoir acidifiant de 15 souches de bactéries lactiques en fonction des paramètres C_m , ΔpH et vitesse d'acidification puis de comparer entre elle et de sélectionner les souches les plus acidifiantes en culture pure et en culture mixte.

D'après les résultats obtenus, nous avons pu déduire que, même au sein d'un même genre, il existe des variations entre les souches. Le pouvoir acidifiant diffère d'une souche de bactérie lactique à une autre. En effet les souches Lacto 16 Lb, Lacto 3Br, Lacto 13 Br présentent une forte capacité d'acidification contrairement aux espèces : Lato 8 Lb et Lacto 16 Lb 1 du genre *lactobacillus* et la souche Ln 7 Br présente une forte capacité d'acidification contrairement aux espèces Ln 12 Lb et Ln 3 Lb du genre *Leuconstoc*.

Selon notre étude en termes d'acidification en culture mixte, nous avons pu constater qu'il existe des interactions positives entre les souches qui sont regroupées sous le terme de coopération, on cite : *Ln 18 Br* avec *Lacto 8 Lb* et *Ln 18 Br* avec *Lacto 10 Lb*.

Références bibliographiques

A

- ❖ **Abutarboush H. M. (1996).** Comparision of growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.*, **79**, 336-371.
- ❖ **Alice A. & Sanchez-Rivas C. (1997).** DNA supercoiling and osmoresistance in *bacillus substilis* 168. *Current microbiology*, **35** : 309-315.
- ❖ **Amran A and Prigent Y., (1998).** Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process biochemistry*, **34**: 1-10.
- ❖ **Amran A and Prigent Y., (1999).** Influence of yeast exact concentration on batch culture of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling, *world journal of microbiology and biotechnology*, **14**: 529-534.
- ❖ **Arabias. N, Poveda J.M, Sesena. S, Palop. LI, Cabezas.L,** Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use adjunct starts cultures, *Food control*, 20 (2009) 1092-1098.
- ❖ **Axelsson L. (2004).** Classification and physiology. In: lactic acid bacteria Microbiological and functional aspects (salminen S., Wright A.V et Ouwehand A). 3 Ed., Marcel Dekker, Inc New york., 1-66.
- ❖ **Azcarate- Peril M.A., McAuliffe O., Altermann, E. Lick, S., Russel W.M. & Klaenhammer, T.R. (2005).** Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophiles*. *Appl Environ Microbiol.* **71**,5794-5804.

B

- ❖ **Badaoui Dj. (2000) :** contribution à la connaissance du lait de chamelle : Essai de caractérisation des protéines par Electrophorèse sur gel Poly-Acrylamide (PAGE). Thèse d'Ingéniorat. Institut d'agronomie Saharienne. Université d'Ouargla, pp 1-65.
- ❖ **Beal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P., 2008.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotique. *In* : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc*, Lavoisier. Paris. 661-765.

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

C

- ❖ **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.
- ❖ **Chamba J. F., 1990.** Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles. Revue laitière française, 492 : 47-50.
- ❖ **Carr F. J., Chili D. et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria a literature survey. Crit Rev Microbiol., **28** :28-370.
- ❖ **Chikahira M. et Hamada K. (1988), Jpn .J. Vet. Sci. 50:865-873.**
- ❖ **Chowdhury M.A.R. et al. (1987), J.Clin.Microbiol. 25:2200-2203.**
- ❖ **Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., and Fernandes, I. (1997).** Characterization od lactic acide bacteria in attrtisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64,409-421.

D

- ❖ **Dellaglio F. 1989.** Characteristics of thermophilic lactic acid bacteria. Les laits fermentés. Actualité de la recherche. pp. 11-18.
- ❖ **De Man, J., Rogosa, M. et Sharpe, M.E.,** "A medium for the cultivation of Lactobacilli", *J.Appl. Bacteriol.*, 23(1960), pp. 130-135.
- ❖ **De Roissart, H. B., 1986.** Bacteries lactiques dans le lait et produits laitieres Ed technique et documentation. Lavoisier. Paris. 445p.
- ❖ **De Roissart H., & Luquet F. M. (1994).** Bacteries lactiques, **2**, Lorica (chemain de saint Georges, F-384. 10, France), pp 25-428.
- ❖ **De Vuyst L. 2000.** Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. Food Technol. Biotechnol. 38(2):105.

- ❖ **Delgado A, Dulce B, Pedro F, Cidalia P,J. et Figuirodo M. (2001).** Antimicrobiol activity of *L. Plantarum*, isolated from a traditional lactic acide fermentation of table olives *lait* 81: 203-215.
- ❖ **Desmazeaud, M., (1992).** Les bacteies lactiques In : les groups microbiens d'interet laitier.
- ❖ **Dicks L.M, Dellaglio. F. and Collins, M.D. (1995).** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *oenococcus oeni*, Journal of systematic bacteriology, **45**, 395-397.
- ❖ **Desmazeaud, M., 1996.** Les bacteries lactiques dans l'alimentation humaine : utilization et innocuité. Cahiers Agriculture, 5, pp : 331-343.
- ❖ **Dortu. C, Thonart. P.** Les bactériocine des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (2009) 143-154.

F

- ❖ **Farah Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk; review. *J. Dairy Res.*, **60**, 603-626.
- ❖ **Fox P. F. (1993).** Cheese: an overview. In cheese: chemistry. Physics microbiology, 1-36.

G

- ❖ **Gunzle G. Michael, Alexandra Holtzel, jens Walter, Gunther jung, et Walter P. Hammes 2000).** Characterization of Rentericlin Produced By *Lactobacullus Reuteri* Lth 2584 *Appl And Environ, Microbiol p* 4325-4333.
- ❖ **Guiraud JP. (1998).** Microbiologie alimentaire, Edition : DUNOD, 615 p.
- ❖ **Guiraud J-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod Paris. 651p.
- ❖ **Gupta R.K. et al. (1992), infect. Immun.** 60:3201-3208.

H

- ❖ **Hasaine O.; Zadi-Karam H. et Karam N-E. 2008.** Phenotypique identification and proprieties of lactic acid bacteria isolated From three breeds dromedary raw milks in south Algeria. Emir. J. Food Agric. 20. (1): 46-59.
- ❖ **Holzappel W. H.; Haberber P.; Geisen R.; Björkroth J. et Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73(Suppl) : 365 S-73S.

K

- ❖ **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.
- ❖ **Klontz K.C. and Desenclos C.A. (1990).** J. Diarrh. Dis. Res. 8 : 1-2.
- ❖ **Krieg N.R (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria- Identification of procaryotes. **In** Bergey's manuel of systematic Bacteriology. Garrity G. M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilinks, Baltimor., 721, 33 -38.

L

- ❖ **Larpent J.P.; 1997.** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 1041 P.
- ❖ **Lenoir J., Hermier J., Weber. F., 1992.** Les groupes microbiens d'intérêt laitiers, Ed Cidil, p30-50.
- ❖ **Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B. (2008).** Bergey's taxonomic outlines-revised Road Map tio the Phylum Firmicutes. Vol. 3. Disponible sur http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_Vol_3_Outline.pdf.
- ❖ Laurent S., Federighi M., Jouve J. L., 1998. Manuel de Bactériologies alimentaire, polytechnica, Paris, 308P.

M

- ❖ **Mathieu J. (1998):** Initiation à la physic-chimie du lait. *Tec & Doc.*, 1^{ère} Ed *lavoisier*, Paris.

N

- ❖ **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 cours de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé de zébu. *J. Food. Eng.* 57: 301.

P

- ❖ **Prescott L.M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1999).** *Microbiology, 4th edn. New York: WCB/McGraw-Hill.*

S

- ❖ **Samelis J. ; Maurogenakis F. et Metaxopoulos J. (1994).** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology.* 23: 179-196.
- ❖ **Sboui A.; Khorchani T.; Djegham. M et Belhadj O. (2009).** Comparaison de la composition physico-chimique du lait camelin et bovin du sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique SCIENCE* 05(2) 293-034.
- ❖ **Schleifer K. H. & Ludwig, W. (1995).** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System appl microbiol* 18, 461-467.
- ❖ **Siboukeur O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractérisation physico-chimique et microbiologique ; aptitude à la coagulation. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique EL-Harrach-Alger, 135p.
- ❖ **Sina L. (1992).** Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par soca, Thèse de doctorat en MÉDECINE VÉTÉRINAIRE, université de dakar, 245 p.
- ❖ **Stiles M. E. & Holzappel W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36 : 1-29.

T

- ❖ **Tailliez, P. (2001).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y'a près de trois milliard d'années. Les, 81 : 1-11.
- ❖ **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 (Niger), 5-8/11/03.

V

- ❖ **Vali M., Sauer M., Branduarddi P., Borth N., Porro D and Mattanovich D., 2006.** Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cervisia* by cell sorting for height intracellular pH. Applied and environmental microbiology, 5492-5499.
- ❖ **Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol Rev** **60** : 407-438.

Z

- ❖ **Zarour, K., Benmchernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Budjema, B., Henni, J.E., et Kihal, M., 2012.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *leuconostc mesenteroides* isolées du lait cru de chevre et de chamelle d'Algerie. Nature et Technologie. Algérie.

Annexes

Annexe I :

Le milieu MRS

- peptone10g
- extrait de viande.....10g
- extrait de levure5g
- glucose.....20g
- tween 80.....1ml
- Phosphate dipotassique.....2g
- acétate de sodium5g
- citrate triammoniaque.....2g
- sulfate de magnésium.....200mg=0,2g
- sulfate de manganèse.....50mg=0,05g

Autoclavage à 120°C pendant 20 min.

pH= 6,5

Annexe II :

Coloration de Gram :

- 1- Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame bien propre
- 2- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène pendant 30s a 1 min
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes

7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette

8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes

9- Couvrir avec de la fuschine pendant 30 secondes

10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes, sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène

11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram (+) absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe III: appareillage utilisé



Spectrophotomètre de type UV/VIS UV-9200



pH mètre de type (HANNA).



Coagulation de quelques souches de bactéries lactiques

Annexe IV:

Tableau I: mesure du pH des différentes souches en fonction du temps sur bouillon MRS.

Souches	PH après					ΔpH après		
	T0	3H	6H	24H	48H	6H	24H	48H
<i>Lacto 6Lb</i>	4,87	4,34	3,78	3,32	3,31	1,09	1,55	1,56
<i>Lacto 16Lb1</i>	4,82	4,44	3,91	3,36	3,47	0,91	1,46	1,35
<i>Lacto 16 Lb</i>	4,81	4,44	3,87	3,00	3,39	0,94	1,81	1,42
<i>Lacto 8 Lb</i>	4,72	4,34	3,83	3,37	3,50	0,89	1,35	1,22
<i>Lacto 3 Br</i>	4,95	4,48	3,85	3,21	3,37	1,1	1,74	1,58
<i>Lacto 15 Br</i>	5,28	4,86	4,04	3,34	3,42	1,24	1,94	1,86
<i>Lacto 10 Lb</i>	5,96	4,48	3,83	3,42	3,40	2,13	2,54	2,56
<i>Lacto 12 Lb</i>	4,76	4,28	3,78	3,24	3,26	0,98	1,52	1,5
<i>Lacto 7 Br</i>	5,35	4,94	4,13	3,36	3,41	1,22	1,99	1,94
<i>Lacto 13 Br</i>	4,79	4,49	3,83	3,38	3,39	0,96	1,41	1,4
<i>Lacto 9 Br</i>	4,77	4,25	3,85	3,35	3,36	0,92	1,42	1,41
<i>Ln 18 Br</i>	5,43	5,12	4,17	3,42	3,50	1,26	2,01	1,93
<i>Ln 7 Br</i>	4,92	4,52	3,99	3,33	3,42	0,93	1,59	1,5
<i>Ln 3 Lb</i>	5,18	4,74	3,98	3,52	3,43	1,2	1,66	1,75

<i>Ln 12 Lb</i>	4,75	4,29	3,82	3,27	3,32	0,93	1,51	1,43
-----------------	------	------	------	------	------	------	------	------

Tableau II : mesure de l'acidité titrable des différentes souches en fonction du temps sur bouillon MRS.

Souches	Acidité après					Cm	
	T0	3H	6H	24H	48H	24H	48H
<i>Lacto 6Lb</i>	15	18	24	52	45	37	30
<i>Lacto 16Lb1</i>	15	21	25	55	62	40	47
<i>Lacto 16 Lb</i>	18	23	21	64	647	46	467
<i>Lacto 8 Lb</i>	13	20	30	42	60	29	47
<i>Lacto3Br</i>	20	21	30	70	82	50	62
<i>Lacto 15 Br</i>	10	11	29	52	52	42	42
<i>Lacto 10 Lb</i>	10	20	26	30	44	20	34
<i>Lacto 12 Lb</i>	11	16	28	46	95	35	84
<i>Lacto 7 Br</i>	8	16	20	38	42	30	34
<i>Lacto 13 Br</i>	16	25	27	54	31	38	15
<i>Lacto 9 Br</i>	13	15	22	36	46	23	33
<i>Ln 18</i>	15	16	20	48	40	33	25
<i>Ln 7 Br</i>	15	17	34	53	46	38	31
<i>Ln 3 Lb</i>	11	14	27	29	33	18	22
<i>Ln 12 Lb</i>	11	16	25	49	45	38	34

Tableau III : mesure du pH des différentes souches en fonction du temps dans le lait.

Souches	PH après					Δ pH après		
	T0	3H	6H	24H	48H	6 H	24 H	48H
Lacto 6Lb	6,41	6,22	5,84	4,85	4,34	0,57	1,56	2,07
Lacto 16Lb1	6,63	6,36	6,26	5,58	4,45	0,37	1,05	2,18
Lacto 16 Lb	6,37	5,65	5,27	4,40	4,08	1,1	1,97	2,29
Lacto 8 Lb	6,56	6,26	5,73	4,89	4,45	0,83	1,67	2,11
Lacto 3 Br	6,23	5,77	5,36	4,40	4,08	0,87	1,83	2,15
Lacto 15 Br	6,46	6,18	5,91	4,78	4,13	0,55	1,68	2,33
Lacto 10 Lb	6,51	6,22	5,80	4,82	4,39	0,71	1,69	2,12
Lacto 12 Lb	6,46	6,21	5,84	5,08	4,56	0,62	1,38	1,9
Lacto 7 Br	6,38	6,05	5,74	4,59	4,09	0,64	1,79	2,29
Lacto 13 Br	6,65	6,20	5,79	4,78	4,39	0,86	1,87	2,26
Lacto 9 Br	6,61	6,42	6,24	5,10	4,27	0,37	1,51	2,34
Ln 18 Br	6,36	5,97	5,55	4,73	4,39	0,81	1,63	1,97
Ln 7 Br	6,46	6,05	5,56	4,56	4,16	0,9	1,9	2,3
Ln 3 Lb	6,66	6,53	6,39	5,49	5,01	0,27	1,17	1,65
Ln12Lb	6,59	6,51	6,39	6,00	4,80	0,2	0,59	1,79

Tableau IV : mesure de l'acidité titrable de différentes souches en fonction du temps dans le lait.

Souches	Acidité titrable après					Cm	
	T0	3H	6H	24H	48H	24H	48H
Lacto 6Lb	25	28	37	59	87	34	62
Lacto 16Lb1	21	24	32	40	83	19	62
Lacto 16 Lb	36	40	58	85	137	49	101
Lacto 8 Lb	12	13	28	35	81	23	73
Lacto 3 Br	37	41	68	90	131	55	94
Lacto 15 Br	25	28	35	85	135	60	11
Lacto 10 Lb	19	21	34	36	91	17	72
Lacto 12 Lb	25	30	45	57	90	27	65
Lacto 7 Br	29	30	40	85	125	56	96
Lacto 13 Br	21	2,3	32	58	95	37	74
Lacto 9 Br	27	2,8	30	72	120	45	93
Ln 18 Br	26	35	45	83	135	57	109
Ln 7 Br	22	25	44	70	125	48	103
Ln 3 Lb	13	21	23	40	80	19	59
Ln 12 Lb	18	20	23	25	61	3	39

Tableau V : mesure du pH des différentes souches en fonction du temps dans le lait en culture mixte.

Souches	PH après					Δ pH après		
	T0	3H	6H	24H	48H	6H	24 H	48 H
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Lacto</i> <i>16 Lb</i>	6.12	5,90	5.59	4.37	4.02	0,53	1,75	2,1
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Laco 7</i> <i>Br</i>	6.56	6.36	6.12	4.86	4.06	0,44	1,7	2,5
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Lacto</i> <i>10 Lb</i>	6.43	6.31	6.03	4.69	4.05	0,4	1,74	2,38
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Laco 8</i> <i>Lb</i>	6.46	6.28	6.00	4.67	4.05	0,46	1,79	2,41

Tableau VI : mesure de l'acidité titrable de différentes souches en fonction du temps dans le lait

Souches	Acidité titrable après					Cm après	
	T0	3H	6H	24H	48H	24 H	48 H
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Lacto</i> <i>16 Lb</i>	33	35	47	168	218	135	185
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Laco 7</i> <i>Br</i>	22	28	31	94	120	72	98
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Lacto</i> <i>10 Lb</i>	31	33	38	88	115	57	84
<i>Ln 18 Br</i> + <i>Laco 8</i> <i>Lb</i>	27	30	33	112	165	85	138

Tableau IIIX : Suivie de la densité optique des souches de bactéries lactiques sur bouillon MRS.

souche	Lacto 6 Lb	Lacto 16 Lb1	Lacto 16 Lb	Lacto 8 Lb	Lacto 3 Br	Lacto 15 Br	Lacto 10 Lb	Lacto 12 Lb	Lacto 7 Br	Lacto 13 Br	Lacto 9 Br	Ln 18 Br	Ln 7 Br	Ln 3 Lb	Ln 12 Lb
DO_{600nm}(t=0H)	0.295	0.296	0.322	0.357	0.244	0.207	0.320	0.282	0.148	0.339	0.296	0.149	0.268	0.237	0.334
DO_{600nm}(t=3H)	0.495	0.479	0.540	0.610	0.330	0.485	0.456	0.548	0.470	0.310	0.573	0.406	0.506	0.545	0.513
DO_{600nm}(t=6H)	0.516	0.782	0.652	0.830	0.603	0.933	0.715	0.634	0.828	0.704	0.781	0.816	0.932	0.947	0.642
DO_{600nm}(t=24H)	1.035	1.255	0.915	1.164	1.054	1.239	1.062	0.960	1.228	1.098	1.093	1.163	1.170	1.246	1.077
DO_{600nm}(t=48H)	0.951	1.239	1.023	1.052	1.062	1.221	1.047	0.952	1.292	0.965	1.068	1.116	1.190	1.167	1.010

Résumé

L'étude du pouvoir acidifiant des quinze souches appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, ensemencés dans du lait écrémé, a permis de mesurer le pH et l'acide produit en °D toutes les trois heures pendant 48 H. Le suivi de la cinétique d'acidification de chaque souche ont montrés que les souches *Lacto 16 Lb*, *Lacto 3 Br*, *Lacto 13 Br* et *Ln 7 Br* ont une capacité acidifiante importante contrairement aux espèces : *Ln 12 LB*, *Ln 3 Lb*, *Lacto 8 Lb* et *Lacto 16 Lb1*. Mais les valeurs maximales obtenues après 48 H d'incubation à 30 °C nous ont permis de conclure que nos souches testées en *Leuconostoc* sont en générale faiblement acidifiante, en effet le genre *Leuconostoc* en technologie laitière est utilisé pour pouvoir aromatisant et pour la production du CO₂ alors que la production d'acide est préconisée pour les *Lactobacilles*.

Mots clés : pouvoir acidifiant, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, lait écrémé, pH, acide.

Abstract

The study of acidifying ability of fifteen strains belonging to the genus *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, inoculated in skim milk, allowed us to measure pH and the produced acid (in °D) every 3 hours for 48h. The following of acidification kinetics for each strain has shown that *Lacto 16 Lb*, *Lacto 3 Br*, *Lacto 13 Br* et *Ln 7 Br* have an important acidifying ability, in contrast to *Ln 12 LB*, *Ln 3 Lb*, *Lacto 8 Lb* and *Lacto 16 Lb1*. However, the maximal values obtained after 48 hours of incubation at 30°C allowed us to conclude that the tested strains of *Leuconostoc* are generally weakly acidifying. In fact, the genus *Leuconostoc* is used in dairy technologies for their flavoring ability and production of CO₂, while the production of acid is confined for *Lactobacillus*.

Key words: acidifying ability, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, skim milk, pH, acid.

