

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

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



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

**MASTER**

*Thème*

**Les aptitudes technologiques des bactéries  
lactiques isolées du beurre et du lben**

Présenté par :

**AYADI Samia & KERNOU Sara**

Soutenu le : **14 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M NABTI. EH	MCA	Président
Mme BENACHOUR. K	MAA	Encadreur
Mme LOUILACHE. F	MAA	Examinatrice

**Année universitaire : 2015 / 2016**

## *Remerciement*

Avant tout nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné, le courage, la force,  
La santé et la persistance.

Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice **M<sup>me</sup> Benachour-kada karima** de  
Nous avoir proposé ce thème, pour ses orientations et son suivi durant la période de la  
Réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier vivement **M<sup>r</sup> Nabti. EH** qui nous a fait un immense honneur d'avoir  
Accepté de présider le jury.

Nos reconnaissances remerciements s'adressent également à **M<sup>me</sup> Louilache Titeli Fatiha**  
Qui a accepté d'évaluer et d'examiner ce travail.

Un remerciement très particulier à toutes les Ingénieurs de laboratoire Microbiologie  
Générale (1) Pour les soutiens et leurs infini gentillesse.

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos parents, nos familles Kernou et Ayadi  
Et à tous nos amis pour leurs encouragements et leurs compréhensions.

Enfin, nous ne pouvons pas terminer sans remercier tous nos camarades de la promotion  
Microbiologie Alimentaire et Santé (2015/2016), on vous souhaite tout le bien et toute  
La réussite.

Merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

Louange à Dieu, le tout puissant qui m'a donné la force et le courage d'avoir accompli ce travail, dédier à

Les plus chers à mon cœur sur cette terre, **ma mère** qui a su habilement guider mes premiers pas dans ce monde, et à **mon cher père**, dont le courage l'éducation ont fait de moi ce qui je suis, Dieu vous garde, tout les deux.

A mes **chères sœurs** : Souhila et Lamia, ainsi **leurs époux** (Zillal et Toufik) et à Thiziri et Amina.

A mes **chers frères** : Lyes et sa femme ainsi que Ouanis.

A mes **nièces** et mes **neveux** : Sabrina, wardia inass, moustafa, meriam, imane, et les petits adoré isslam et adam.

A mes chers grand père : moubark et mohind akli

A toutes mes **tantes** et mes **oncles**.

A toutes mes **cousines** et mes **cousins**.

A **Mohamed** qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années universitaires.

A **Ma binôme** et chère amie samia, avec qui j'ai partagé des moments difficiles et des moments agréables le long de ce travail.

A mes **chers amies** : lydia, maya, azza,, assia, wahiba, nawel, aldjia, nouna, lamia, et hind

A vous tous .....merci

Sara

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, source de mon bonheur ;*

*Mon père, et ma mère, en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation, qui mon toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.*

*A mes chères grandes mères, qui n'ont jamais reculé devant aucun sacrifice pour me voir réussir dans ma vie.*

*A Reda pour son soutien et encouragement durant toute la période de la réalisation de ce travail.*

*A mes très chères sœurs Dahia, Tinhinane, Sara ;*

*A mon cher frère Massinissa ;*

*A ma binôme et chère amie Sara, avec qui j'ai partagé des moments difficiles et des moments agréables le long de ce travail.*

*A mes chères amies, Fouzia, Lamia, Farouzia, Sara, Assia.*

*A tous mes proches et tout qui me connaît.*

*Samia*



# Sommaire

# Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01

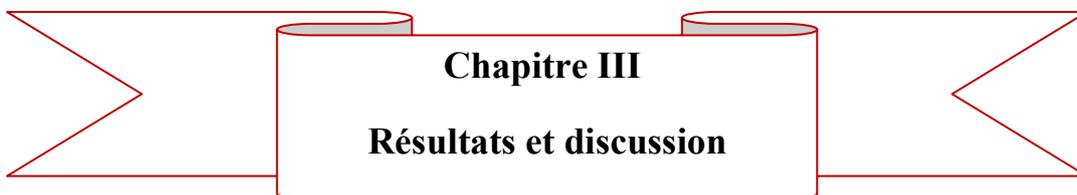
## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralisées sur les bactéries lactiques.....	02
2. Habitats des bactéries lactiques.....	02
3. Taxonomie et classification des bactéries lactiques.....	02
3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	04
1.1.Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	04
4. Principales voies fermentaire des bactéries lactiques .....	05
5. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques.....	05
5.1.Aptitude acidifiante.....	05
5.2.Aptitude protéolytique.....	06
5.3.Aptitude lipolytique.....	06
5.4.Aptitude aromatisant.....	06
5.5.Aptitude texturant.....	07
6. Les applications industrielles des bactéries lactiques.....	07

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Lieu et durée du travail.....	08
2. Origine des souches.....	08
3. Matériels.....	09
3.1 Lait.....	09

1.1.Huile d'olive.....	09
1.2. Glycérol.....	09
1.3. Milieux de cultures.....	09
1.4. Produits chimiques et réactifs.....	09
1.5. Outils de la microbiologie .....	10
2. Revivification des bactéries lactiques.....	10
2.1.Revivification et purification des bactéries lactiques.....	10
2.2.Etudes des caractères morphologiques .....	10
2.2.1. Caractérisation macroscopique.....	10
2.2.2. Caractérisation microscopique.....	10
2.2.3. Test de Production de catalase.....	10
3. standardisation.....	11
4. Etudes de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques.....	11
4.1.Pouvoir acidifiant .....	11
4.2.Pouvoir protéolytique.....	13
4.3.Mesure de l'activité protéolytique des exoprotéases.....	13
4.4.Mesure de l'activité protéolytique des endoprotéases.....	13
4.5.Pouvoir lipolytiques.....	13
4.6.Pouvoir aromatisant .....	13
4.7.Pouvoir épaississant.....	14
4.8.Pouvoir coagulant.....	14
4.9.Pouvoir texturant .....	14
4.9.1. Détection de l'aspect des colonies.....	14
6.9.1. Quantification de la production des exopolysaccharides (EPS).....	14



**Chapitre III**  
**Résultats et discussion**

1. Revivification et identification des bactéries lactiques.....	16
2. Examen macroscopique.....	16
2.1.Milieu liquide.....	16
2.2.Milieu solide.....	17
3. Examen microscopique.....	17

4. Test de catalase.....	18
5. Standardisation.....	18
6. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques.....	19
6.1. Résultats du pouvoir acidifiant.....	19
6.2. Evolution de la vitesse d'acidification et de l'acidité Dornic.....	20
6.3. Résultats du pouvoir protéolytique.....	22
6.3.1. Résultats de l'activité exoprotéasique.....	24
6.3.2. Résultats de l'activité endoprotéasique .....	25
6.4. Résultats du pouvoir lipolytique.....	26
6.5. Résultats du pouvoir aromatisant .....	27
6.6. Résultats du pouvoir épaississant .....	28
6.7. Résultats du pouvoir coagulant.....	28
6.8. Les exopolysaccharides (EPS) :.....	29
6.8.1. Test de la production de dextrane .....	29
6.8.2. Quantification des EPS.....	30
Conclusion.....	32

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des tableaux en annexes

### **Annexe IV**

**Tableau I :** Standardisation

**Tableau II :** Résultats de catalase, coloration de Gram et aspect microscopiques des souches.

### **Annexe V**

**Tableau III :** Résultats de pouvoir acidifiant

**Tableau IV :** Représentation de  $\Delta$  pH et  $\Delta$  acidité Dornic (D°) des souches.

### **Annexe VI**

**Tableau V :** Pouvoir protéolytique

**Tableau VI :** Résultats des exoprotéases

**Tableau VII :** Résultats des endoprotéases

### **Annexe VII**

**Tableau VIII:** Représentation des résultants du pouvoir lipolytique

**Tableau IX :** Pouvoir aromatisant

**Tableau X :** Pouvoir épaississant

**Tableau XI :** Pouvoir coagulant

### **Annexe VIII**

**Tableau XII :** La concentration et l'absorbance de différentes dilutions

**Tableau XIII :** Résultats de quantification des exopolysaccharides (EPS)

## Liste des abréviations

**BAL** : bactéries de l'acide lactiques

**D°** : Degré dornic

**DO** : Densité optique

**EMP**: Embden-Meyerhof-Parnas

**EPS**: exopolysaccharides

**h** : heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : eau oxygénée

**Lb**: *Lactobacillus*

**Ln** : *Leuconostoc*

**MRS**: Man Rogosa Sharp

**N** : normalité

**Na Cl** : Chlorure de sodium

**PH** : Potentiel d'hydrogène

**Sp**: espèce

**Subsp**: sous espèce

**T°**: Température

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UV** : ultra-violet

**V** : volume

**VP** : Voges prostauere

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Le protocole à suivre pour la réalisation du test acidité.....	12
<b>Figure 02 :</b> Aspect de culture pure des bacteries lactiques sur boullion MRS.....	16
<b>Figure 03 :</b> Observation macroscopiques des bactéries lactiques a l'œil nue.....	17
<b>Figure04 :</b> Aspect microscopiques et arrangement des isolats des BAL.....	18
<b>Figure05 :</b> Variation de pH et de l'acidité Dornic chez les souches chez toutes les souches.....	19
<b>Figure 06 :</b> Histogramme de la cinétique d'évolution de $\Delta$ pH.....	20
<b>Figure 07 :</b> Histogramme de la cinétique d'évolution de l' $\Delta$ AD°.....	21
<b>Figure 08 :</b> Activité protéolytique sur milieu MRS au lait .....	23
<b>Figure 09:</b> les diamètres des zones d'hydrolyses des protéines sur gélose MRS additionné de lait partiellement écrémé.....	23
<b>Figure 10:</b> Représentation de L'activité exoprotéasique.....	24
<b>Figure 11:</b> Histogramme des diamètres de l'activité exoprotéasique.....	25
<b>Figure 12:</b> Représentation de l'activité endoprotéasique.....	25
<b>Figure 13:</b> Histogramme des diamètres de l'activité endoprotéasique.....	26
<b>Figure 14:</b> Production d'arome par les bactéries lactiques.....	27
<b>Figure 15:</b> Aspect des gels formés sur lait saccharosé.....	28
<b>Figure 16:</b> Aspect de lait après la coagulation et formation de gel.....	29
<b>Figure 17 :</b> Aspect des colonies sur gélose hypersaccharosée.....	30
<b>Figure 18:</b> Aspect des colonies après l'agrandissement.....	30
<b>Figure 19 :</b> Production des EPS par des bactéries lactiques.....	30
<b>Figure 20:</b> Histogramme de quantification des EPS.....	31

# Introduction

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, sont largement impliquées dans la fabrication des produits laitiers fermentés du fait de leurs activités métaboliques particulières. La production d'acide lactique est essentielle à la production des produits laitiers fermentés et leur confère une saveur typique (**Labaoui et al.,2005**).

Ces bactéries contribuent par leurs activités enzymatiques variées, à la production de composés volatils qui participent au développement de l'arôme, de la saveur, et de la texture de plusieurs produits laitiers. Certaines bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui jouent un rôle important dans le développement de la texture de plusieurs produits laitiers (**Labaoui et al.,2005**).

Ces bactéries présentent un grand intérêt dans l'industrie laitière (**Bakhouche et Baoulahrouf, 2005**). Elles sont parmi les plus importants groupes de micro-organismes utilisés dans la fermentation alimentaires (**Hikmate et al.,2012**).

En industrie alimentaire, les bactéries lactiques sont à l'origine des processus de transformation conditionnant la texture et la qualité organoleptique des produits alimentaires fermentés. (**Ganzele et al., 2000 ; Delgado et al., 2001 ; Tailleux.,2001**)

Cette étude s'intercale dans l'objectif d'étudier quelques aptitudes technologiques de certaines bactéries lactiques (*Lactobacillus, Leuconostoc*).

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres, le premier est consacré à une synthèse bibliographique articulée autour des généralités et la classification des bactéries lactiques, et leurs intérêts dans le domaine industriel, le second chapitre présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, les résultats obtenus et leurs discussions sont rassemblées dans le troisième chapitre.

# **Chapitre I :**

## **Synthèse bibliographique**

### **1-Généralisées sur les bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques sont décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle. Elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Stackebrandt et Goebel, 1994).

Ce sont des coques ou des bacilles, Gram positif, ayant en commun la production d'acide lactique comme produit final de la fermentation des sucres.

Ces bactéries sont des procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Comme elles ne possèdent pas de cytochrome, ces bactéries ne tirent pas leur énergie de la respiration, mais par phosphorylation du substrat au cours de la fermentation des sucres. En effet, les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique en suivant la voie D'Embden-Meyerhof, alors les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique suivant la voie des pentoses phosphates (Prescott et al., 2003).

Il ya plusieurs genres qui figurent dans la catégorie des de bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tertagenococcus* et *Vagococcus* (Klein et al., 1998 ; Guiraud et al., 2003 ; Axelsson, 2004 ; Limsowtin et al., 2004).

### **2-Habitat des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques sont très répandues dans la nature, elles colonisent des milieux naturels riches très différents du point de vue physico-chimique. Elles sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses Humaines et animales et dans le tractus digestif (Drouault et Corthier, 2001).

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

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles

espèces a augmenté énormément au cours de ces dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (**Pot ,2008**).

La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également des critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007**).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (**Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007**).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 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**).

D'après **Ludwig et al (2008)**, le phylum firmicutes comprend 3 classes qui sont: Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi , les bactéries lactiques appartenant à la classe Bacilli sont divisées en trois familles:

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

La classification des bactéries lactiques a été profondément révisée à la lumière des résultats obtenus par les nouvelles méthodes de taxonomie moléculaire. Les caractéristiques détaillées des bactéries lactiques sont données dans un important ouvrage, qui leur est exclusivement consacré, coordonné par **Roissart et Luquet (1994)** ainsi que dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (**Holt et al.,1994**).

### 3-1. Le genre *Lactobacillus* :

C'est le genre principal de la famille lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrés comme contaminants.

Certaines espèces de lactobacilles sont homolactiques et d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et de CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique (**Edwards et al., 2000**).

Les lactobacilles homofermentaire stricte (par exemple les *Lb.delbruekii*), utilisent la voie de la glycolyse, les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés.

Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (par exemple *Lb.casei*), ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses. Les lactobacilles exigent pour leurs développements des milieux bien adaptés, riches en acides aminés, en vitamines et en acides gras, ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques.

Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des produits laitiers, des fruits et légumes (**Rodas et al., 2005 ; Figueiredo et al., 2008**).

### 3-2. Le genre *Leuconostoc* :

Les leuconostoc sont hétérofermentaires, ils produisent de l'acide lactique, CO<sub>2</sub> et l'éthanol. Ce sont des coques groupés en paires ou chaînes, catalase négatif (**Larpen et al., 1997**), leurs températures de croissance se situent entre 25°C-30°C, leur croissance est lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu, (**Guiraud et al., 2003**).

Le genre *Leuconostoc* a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisent pas d'ammoniaque à partir d'arginine, ainsi ce genre est différent des autres coques par la fermentation hétérolactique. Il est facile de confondre les leuconostoc et certains coccobacilles hétérolactiques (**Krieg et al., 2001**).

Les études phylogénétiques des leuconostoc montrent une diversité dans ce genre (**Chenoll et al., 2003 ; Eom et al., 2007 ; Hu et al., 2009**).

Dans l'industrie laitière, les leuconostoc, principalement les *L.mesenteroides subsp cremois* sont utilisés pour produire des substances aromatiques telles que diacétyl et acétoïne à partir des citrates du lait. Certaines espèces de *L.carnosum* ont été proposées pour la bioconservation des produits carnés emballés sous vide et entreposés au froid, contre les

*Listéria monocytogenes* (Budde et al., 2003) . Ce genre également important dans les fermentations naturelles des produits d'origines végétales (Eom et al.,2007).

#### **4. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques :**

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leurs énergie de la fermentation des substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose).

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes:

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaires (Embden Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaires (voie des pentoses phosphate) (Atlan et al.,2008).

#### **5. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques:**

##### **5-1. Aptitude acidifiante :**

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se présenter par:

- 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 des flores pathogènes et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (**Béal et al.,2008 ;Monnet et al.,2008**).

#### **5-2. Aptitude protéolytique :**

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009**).

#### **5-3. Aptitude lipolytique :**

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al.,2008**).

D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009**).

#### **5-4. Aptitude aromatisante :**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006**).

### **5-5.. Aptitude texturante :**

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al.,2007).

### **6. Applications industrielles des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit et al.,2007).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, le beurre, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez et al.,2003).

# **Chapitre II :**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Lieu et durée du travail:

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie générale (bloc09) de la Faculté de Science de la Nature et de la Vie, université A/Mira- Bejaïa, sous la direction et l'orientation du M<sup>me</sup> Benachour.K durant la période allant du mois de janvier au mois d'avril 2016.

## 2. Origine des souches:

Les bactéries lactiques étudiées ont été isolées à partir du lben et de beurre de la région du Bejaïa. Les noms et abréviations de ces bactéries sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau I** : Représentation des codes des souches étudiées

<b>L'abréviation</b>	<b>Le nom</b>
<b>S1</b>	Ln 12Lb
<b>S2</b>	Ln 18 Br
<b>S3</b>	Ln 7Br
<b>S4</b>	Ln 3Lb
<b>S5</b>	Lato 9Br
<b>S6</b>	Lacto 3Br
<b>S7</b>	Lacto 7Br
<b>S8</b>	Lacto 16 Lb
<b>S9</b>	Lacto 16 Lb <sub>1</sub>
<b>S10</b>	Lacto 16 Lb <sub>2</sub>
<b>S11</b>	Lacto 6Lb
<b>S12</b>	Lacto 15Br
<b>S13</b>	Lacto 10Lb
<b>S14</b>	Lacto 13Br
<b>S15</b>	Lacto 8Lb <sub>1</sub>
<b>S16</b>	Lacto 12Lb
<b>S17</b>	<i>Lb plantarum</i>

### **3. Matériel:**

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant:

**3.1. Lait:** Le lait écrémé liquide (**Candia**) a été utilisé pour l'étude de pouvoir acidifiant et protéolytique des bactéries lactiques ainsi que pour le pouvoir aromatisant, coagulant et les activités des exoprotéases et endoprotéases, et le lait écrémé en poudre additionné de saccharose à 12% utilisé pour évaluer le pouvoir épaississant.

**3.2. Huile d'olive :** elle est utilisée pour l'étude du pouvoir lipolytique dans des milieux solides (gélose MRS) par la technique des spots.

**3.3. Glycérol:** Il est utilisé pour l'étude du pouvoir lipolytique dans des milieux solides (gélose MRS) par la technique des spots.

**3.4. Milieux de culture:** Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de ce travail :

- **Les géloses :**

- ◆ Gélose MRS (Institut Pasteur d'Algérie) : est utilisé pour les cultures bactériennes, dans les différents tests.
- ◆ La gélose MRS additionnée du lait écrémé, utilisé pour l'étude du pouvoir protéolytique, ainsi que le comportement des exoprotéases et des endoprotéases.
- ◆ La gélose MRS additionné de l'huile d'olive pour l'étude du pouvoir lipolytique.
- ◆ La gélose MRS additionné du glycérol pour l'étude du pouvoir lipolytique.
- ◆ La gélose hypersaccharosée (MRS+ 15% de saccharose).

- **Les bouillons :**

- ◆ Bouillon MRS (Institut Pasteur d'Algérie) : pour la revivification, les repiquages ainsi que la croissance des bactéries lactiques (BAL)
- ◆ Bouillon clark et lubs (Institut Pasteur d'Algérie) : pour l'étude du pouvoir aromatisant.

La composition par litre des différents milieux utilisés est indiquée en (**Annexe I**).

### **3.5. Produits chimiques et réactifs:**

- **Les colorants :** Violet de Gentiane, fuschine, bleu de méthylène de marque (Biochem chemopharma), phénolphtaléine à 1%.

- **Les acides et bases** : NaOH (chem-LAB). , HCL (Biochem chemopharma), pour ajuster le pH des milieux utilisés.

- **Les réactifs** : Le réactif de Vogues Proskauer (VPI et VPII).

- **Alcool et autres** : lugol, eau oxygénée. L'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Biochem chemopharma), eau physiologique, Huile à émulsions (Biochem chemopharma) éthanol (SIGMA-ALORICH).

**3.6. Outils de la microbiologie** : Anse de platine, bec benzène, boîte pétri, épindorfs, falcons (15ml), pipette Pasteur, lame et lamelle, microscope optique, tubes à essai, flacon (250ml).

#### **4. Revivification des bactéries lactiques:**

##### **4.1. Revivification et purification des bactéries lactiques:**

La revivification a été réalisée sur des bouillons MRS, avec une incubation à 30°C pendant 24h. La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, l'incubation est faite à 30°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme indiquant sur la pureté des souches.

##### **4.2.-Etude de caractères morphologiques:**

###### **4.2.1. Caractérisation macroscopique:**

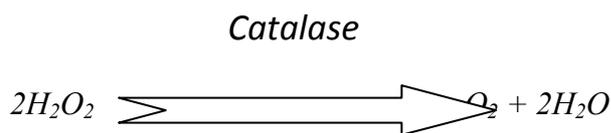
En ce basant sur l'observation à l'œil nu des colonies de Lactobacilles et Leuconostoc afin de déterminer l'aspect, la taille, la forme, et la couleur des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose MRS.

###### **4.2.2 Caractérisation microscopique:**

L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram, **tableau II (Annexe IV)**, sur une culture jeune de 24h, Elle permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association, après réalisation des frottis colorés.

##### **4.3. Test de production de catalase:**

La catalase est une enzyme respiratoire produite par les bactéries aérobies strictes ou facultatives. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) et en oxygène (O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante:



Pour mettre en évidence la production de cette enzyme, on prélève une colonie bien isolée, qu'on étale avec l'anse de platine sur une lame et on ajoute une goutte d'eau oxygénée à 10%. La présence de catalase se manifeste par une effervescence qui indique une formation de bulles d'air, dues à la dégradation de l'eau oxygénée (Guiraud, 1998 ; Prescott, 2003).

## **5. La standardisation :**

Cette étape consiste à la détermination de la concentration des cultures bactériennes exprimée par (UFC/ml) issus d'un ensemencement de 2 à 3 colonies des cultures fraîches de 24h/37°C. Cette concentration est évaluée par le dénombrement des dilutions décimales ( $10^{-7}$  à  $10^{-9}$ ).

## **6. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques:**

### **6.1. Pouvoir acidifiant:**

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude.

On commence par la répartition du lait écrémé dans des flacons stériles à raison de (V/100V). Après incubation à 30°C, à un intervalle du temps 2h, 4h, 6h, 8h, 24h et 48h; 10ml du lait sont prélevés stérilement puis titrer par la soude Dornic (N/9) on ajoutant préalablement 2 à 3 gouttes de Phénolphtaléine à 1% (alcool), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistante au moins 10 secondes (Larpent, 1997).

L'acidité est déterminée par la formule :

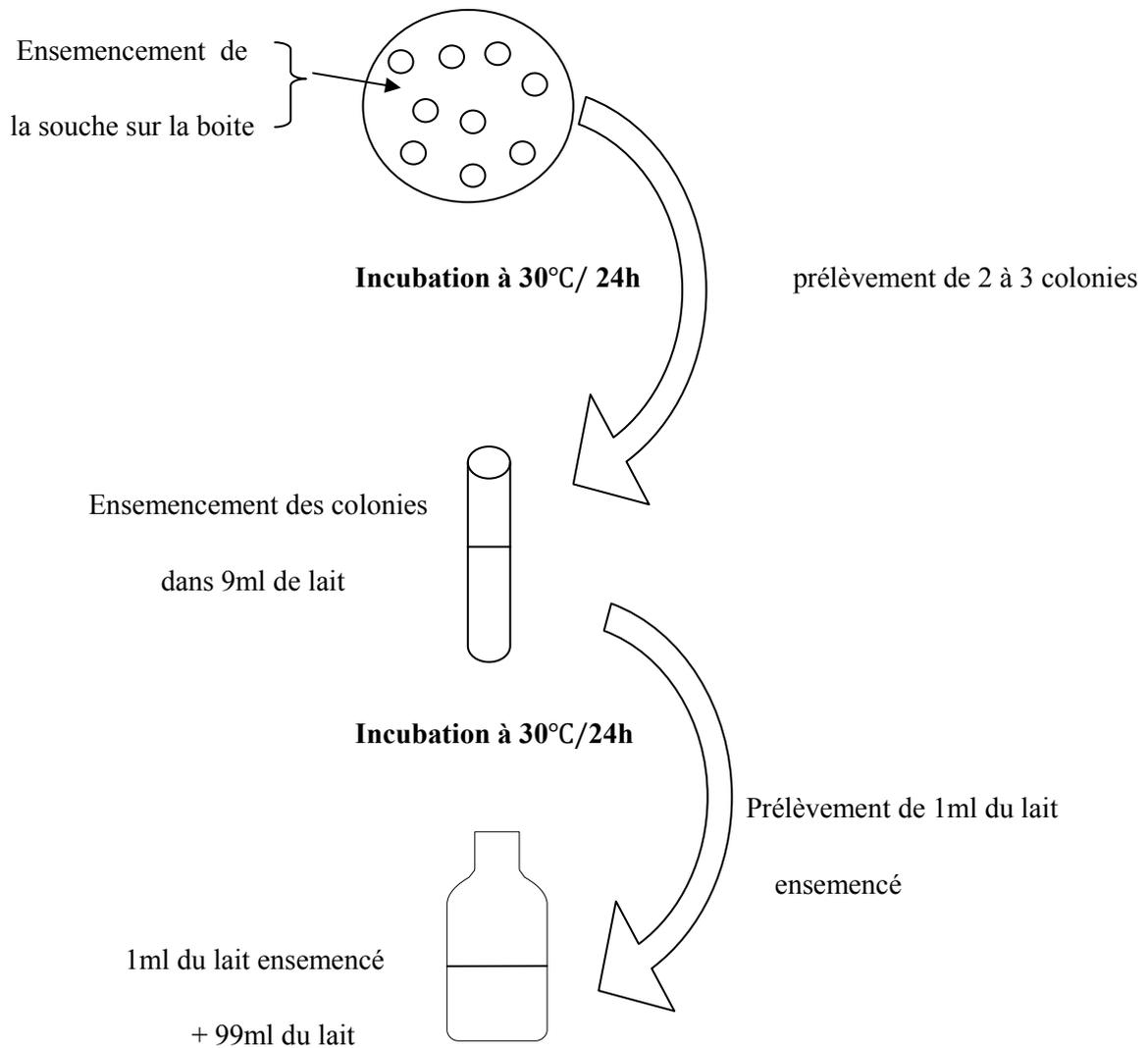
$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10 \quad \text{Où :}$$

$V_{\text{NaOH}}$ : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre (BOECO), en plongeant l'électrode dans le volume du lait.

Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

$$1^{\circ}D = 0,1\text{g d'acide lactique dans 1litre de lait. (Guiraud, 1998).}$$



Suivre de l'évolution du pH et l'acidité à t=0h, t=2h, 4h, 6h, 8h, 24h et 48h.

- ◆ **Le pH:** On le mesure directement à l'aide d'un pH-mètre.
- ◆ **L'acidité:** On mesure le volume de la soude utilisé pour titrer l'acide lactique.

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

**1D° = 0,1g d'acide lactique dans 1 litre de lait.**

**Figure1:** Le protocole à suivre pour la réalisation du test acidité.

## **6.2. Le pouvoir protéolytique:**

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 25% a été coulée, séchée stérilement, puis des spots de 5µl contenant la culture jeune sont déposés sur les boîtes. Après une incubation à 30° C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones opaques autour des spots. **(Veuillemard, 1986).**

## **6.3. Mesure de l'activité protéolytique des exoprotéases :**

La culture jeune (de 18h) a été centrifugées à froid à 9600 rpm/ 6min et les surnageants sont récupérés.

Après la préparation de la gélose MRS additionné de lait écrémé, des puits ont été formés, chaque puits reçoit 100µl du surnageant, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité exoprotéolytique est estimée par mesure des halos clairs autour de chaque puits. . **(Roudj et al., 2009)**

## **6.4. Mesure de l'activité protéolytique des endoprotéases:**

La culture jeune (de 18h) a été centrifugées à froid à 9600 rpm/ 6min, les culots ont été lavés deux fois, le premier lavage avec du l'eau physiologique, et le deuxième avec l'eau physiologique en ajoutant des billes (pour la lyse cellulaire), Le surnageant récupéré est testé par la méthode des puits. **(Desmazeaud et Vassal, 1979)**

## **6.5. Pouvoir lipolytique:**

La lipolyse est mises en évidence par deux méthodes, sur gélose additionnée de d'huile d'olive ou de glycérol stérile à 1%, ces dernières ont été coulées et solidifiées. Des spots de la culture jeune ont été déposés en surface de cette gélose. Après une incubation à 30°C pendant 72h, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des spots. **(Guiraud, 2003).**

## **6.6. Pouvoir aromatisant:**

La capacité des souches à produire des composés aromatisants au cours de leur croissance peut être mise en évidence sur lait écrémé stérile ainsi que le milieu de clark et lubs. Chaque tube contenant du lait écrémé stérile et le milieu précédent a été ensemencé par une des souches

Après incubation à 30°C pendant 24h à 48h (coagulation du lait et troublement de milieu), les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII ont été ajoutés et laissés reposer. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge. . (**Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Zourari et al ., 1991 ; Facklamet Elliot, 1995**)

### **6.7. Pouvoir épaississant:**

Ce test a été réalisé par ensemencement du lait écrémé stérile reconstitué à 12% additionné de saccharose à 12%, par la culture bactérienne (2V/ 10V). L'incubation a été faite à 30°C pendant 24h.

Le pouvoir épaississant présent si le gel formé présente une certaine rhéologie visqueuse (**Bourgeois et Leveau ,1991**).

### **6.8 Pouvoir coagulant:**

Ce test a été réalisé comme suite, 100ml du lait écrémé stérile a été inoculé par 3ml de ferment. Après une incubation à 30°C pendant 24h, on mesure le volume de lactosérum exsudé et on note l'aspect du coagulum obtenu (**Bourgeois et Leveau ,1991**)

### **6.9. Pouvoir texturant:**

#### **6.9.1. Détection de l'aspect des colonies:**

Les souches ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée. Après incubation à 30°C pendant une semaine, la production des exopolysaccharides est détectée par l'apparition des colonies larges et gluantes (**Leveau et al.,1991**).

#### **6.9.2. Quantification de la production d'exopolysaccharides (EPS):**

Cette technique de quantification est celle de (**Mozi et al.,2001 et Wu et al.,2010**) : Pour chaque souche, 10 ml du bouillon MRS a été inoculé par 100µl de la culture à tester. Après une incubation à 30°C pendant 24h, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 15min.

Un volume de 5ml de surnageant ont été récupérées en ajoutant 10ml de l'éthanol à raison de (1V/2V), le tout a été incubé à 4°C pendant une nuit.

Une 2<sup>ème</sup> centrifugation à 6000 rpm pendant 5min a été réalisée, les précipités ont été récupérée, Ces derniers ont été resuspendus dans 200  $\mu$ l d'eau distillée. Chaque mélange de (précipité-eau) a été filtré sur un millipore de 0.22  $\mu$ m de porosité.

Après la filtration :

Dans le protocole pour chaque 800 $\mu$ l de filtrat on ajoute 2ml d'acide sulfurique concentré, dans cette étude, les volumes des filtrats sont compris entre 300 $\mu$ l et 400 $\mu$ l pour cela, le volume d'acide sulfurique concentré ajouté varié de 750  $\mu$ l à 1ml.

Suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 490nm (DO490), les résultats sont exprimés en grammes des exopolysaccharides (EPS) par litre (g/l).

Le taux de sucre est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage tracé en utilisant le glucose **figure 21 (AnnexeVIII)**.

# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussion**

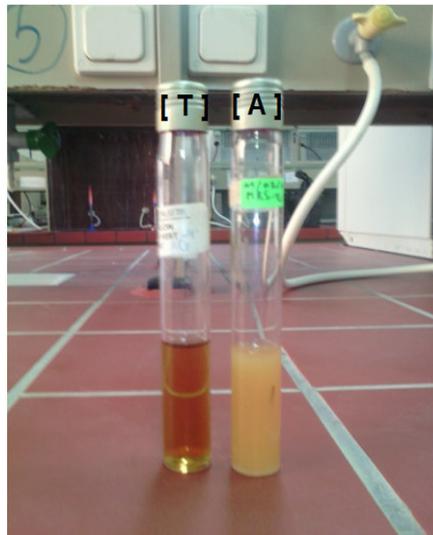
## **1. Revivification et vérification de la pureté des bactéries lactiques utilisées :**

Les caractères morphologiques et culturaux des colonies obtenues à 30°C sur gélose MRS, sont illustrés dans le **tableau II (Annexe IV)** ainsi que l'aspect microscopiques des cellules indiquent que ces bactéries sont des lactobacilles et des leuconostoc.

## **2. Examen macroscopique :**

### **2.1. Milieu liquide :**

L'observation macroscopique du développement des bactéries lactiques dans le bouillon MRS, apparaissent sous forme de trouble concentré au fond du tube **figure 02**.



**Figure 02 :** Aspect de la culture pure des bactéries lactiques sur bouillon MRS. [T] : témoin, [A] : culture bactérienne (trouble).

Dans le bouillon MRS, la croissance bactérienne apparaît sous forme d'un trouble, les souches bactériennes présentent un trouble concentré, ces résultats sont en accord avec celles trouvées par (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002)

## 2.2. Milieu solide :

Les résultats de l'examen macroscopique sur gélose MRS est illustré dans la **figure 03**. Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies.



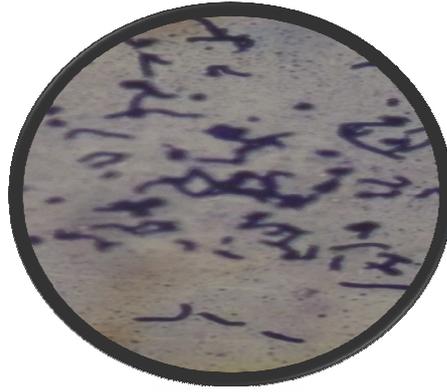
**Figure 03** : Observation macroscopique des bactéries lactiques a l'œil nu.

[A]:Aspect macroscopique des leuconostoc, [B] : Aspect macroscopique des lactobacilles.

Cette observation macroscopique nous ont permis de révéler que les colonies des bactéries étudiés sont rondes de couleur blanchâtres, crémeuse pour les lactobacilles, et pour les leuconostoc sont rondes lenticulaires de couleur crémeuse, Les résultats obtenus se rassemble à celle trouvées par (Kihal ,1996 ; Carr et *al.*,2002 ;Badis et *al.*, 2005).

## 2. Examen microscopique :

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram (**Annexe III**), qui a montré que la plupart des souches étudiées sont des bacilles ou coccobacilles en chainettes parfois isolées, et sont toutes de Gram positifs, **tableau II (Annexe IV)**.



**Figure 04 :** Aspect microscopiques et arrangement des isolats des bactéries lactiques, après coloration de Gram (10x 100).

### **3. Test de catalase :**

Les souches étudiées sont catalase négative car on n'a pas obtenus de l'effervescence après le dépôt de l'eau oxygéné sur les colonies cibles, Ces résultats conformes aux résultats trouvés par (Carr et *al.*,2002).

### **4. Standardisation :**

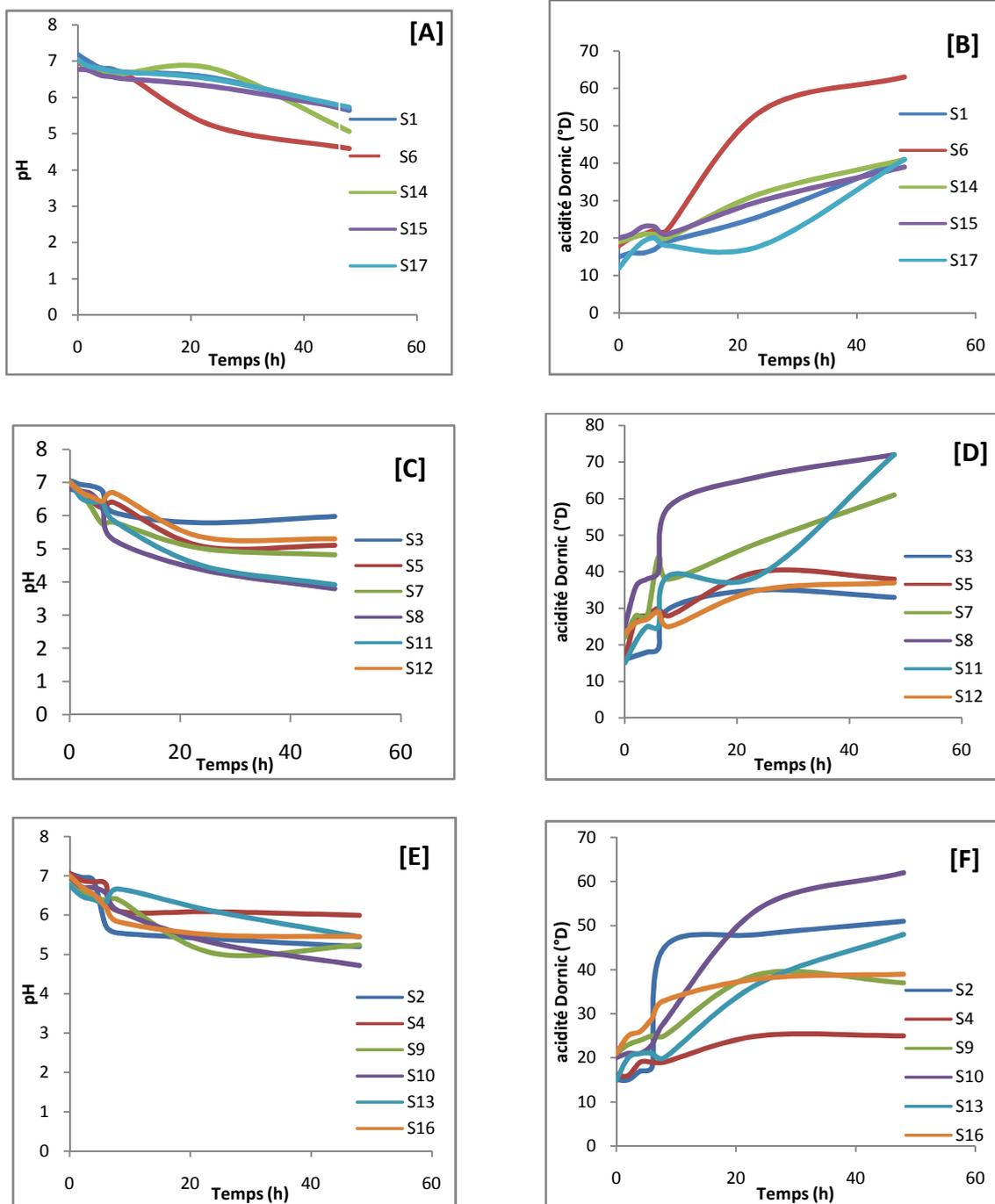
Les résultats de la standardisation sont illustrées dans le **tableau I, (Annexe IV)**, ou il ya les concentrations initiale des souches.

Les souches étudiées présentent une concentration de  $4,33.10^{10}$  UFC/ml à la moyenne.

## **6. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :**

### **6.1. Pouvoir acidifiant dans le lait:**

Les bactéries lactiques sont connues par leurs pouvoir acidifiant, les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 05**, .L'évolution du pH et l'acidité sont résumés dans **tableau III, Annexe V**).



**Figure 05:** Variation de pH et de l'acidité Dornic chez les souches toutes les souches étudiées.

**[A] et [B]:** Courbes de cinétique de pH et d'acidité Dornic des souches S1, S6, S14, S15 et S17.

**[C] et [D]:** Courbes de cinétique de pH des d'acidité Dornic des souches S3, S5, S7, S8, S11 et S12.

**[E] et [F]:** Courbes de cinétique de pH des d'acidité Dornic des souches S2, S4, S9, S10, S13 et S16.

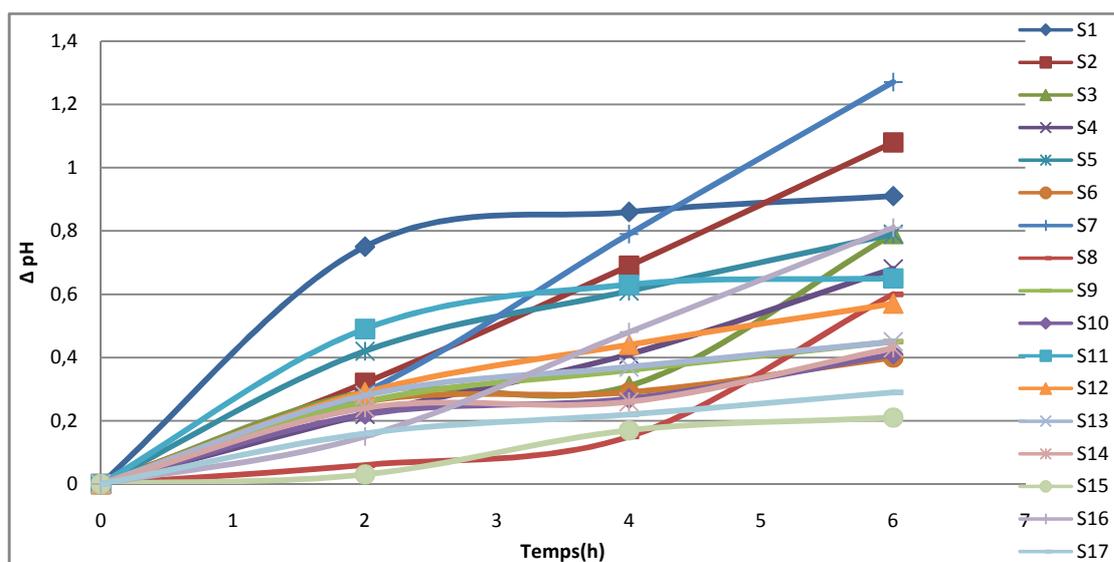
D'après les résultats obtenus, nous remarquons que toutes les souches étudiées ont un pouvoir acidifiant remarquable, elles produisent l'acide lactique progressivement en fonction du temps, cette acidité produite est accompagnée d'un abaissement du pH du lait et de sa coagulation.

Le pH initiale des souches utilisées pour réaliser ce test est d'une moyenne de pH=6,98 et leurs acidités Dornic varie entre 12°D et 25°D, les valeurs de pH obtenus après 2h d'incubation à 30°C varient entre pH=6,49 et pH=6,98 alors les valeurs de cette acidité compris entre 15°D et 36°D.

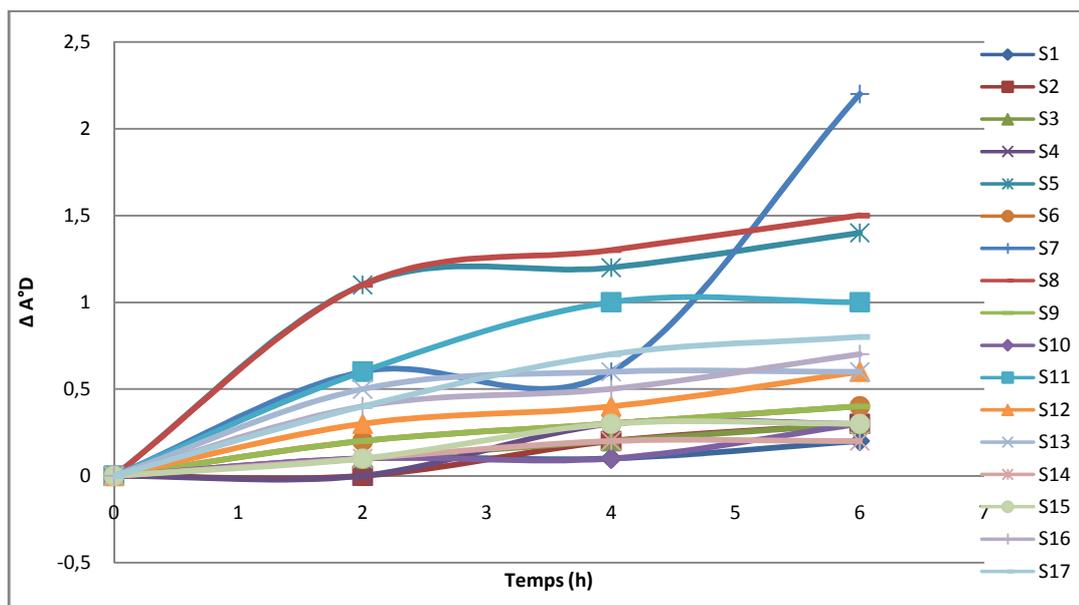
Après 24h de croissance, les valeurs de l'acidité Dornic sont de l'ordre de (18°D à 66°D) et les valeurs de pH varient entre pH=6,54 et pH=4,37. Les souches S8 et S11 (**graphe C**) sont considérées comme les plus acidifiantes, avec une acidité Dornic de l'ordre de 72°D et 78°D(**graphe D**) au bout de 48h et un pH atteint 3,80 et 3,92 respectivement, par contre les souches S3 et S4 ont le plus faible pouvoir acidifiant car elles révèlent des valeurs de l'acidité Dornic de 33°D et 25°D (**graphe D, F**) et leurs pH varient respectivement entre pH=5,98 et pH=6 (**graphe C,E**).

## 6.2. Evolution de la vitesse d'acidification et de l'acidité Dornic :

Les résultats de l'évolution de la vitesse d'acidification et de l'acidité Dornic sont présentés dans le **tableau IV (Annexe V)** et **les figures 06 et 07**.



**Figure 06 :** Histogramme de la cinétique d'évolution de  $\Delta$  pH.



**Figure 07:** Histogramme de la cinétique d'évolution de l'ΔA°D.

On remarque qu'il ya une variabilité entre les vitesses d'acidification des espèces de même genre et même entre les souches de même espèce comme il est été soulevée par **Luquet et carrieu (2005)**. Les résultats de la cinétique d'acidification ont montrées que la diminution de pH du lait par les souches des Lactobacilles a été plus élevée que celle due aux Leuconostoc avec une moyenne de pH=6,38 et pH=6,75 respectivement, ces résultats sont en accord avec **Sanchez et al (2006)** qui est constaté que les bactéries appartiennent au genre Lactobacille ont une acidification plus grande en comparant a celle produite par les Leuconostoc, car les quatre souches de Leuconostoc ( S1,S3 et S2 S4) présentent un pH de 6,8 à 6,71 (**graphes A, C et E**) et des valeurs de 17 à 19°D de l'acidité (**graphes B, D et F**) et des vitesses d'acidifications très faible ( $\Delta \text{pH}=0,4\text{U}$  à  $\Delta \text{pH}=0,27\text{U}$ ) et ( $\Delta \text{A}^{\circ}\text{D}=0,2\text{U}$  à  $\Delta \text{A}^{\circ}\text{D}=0,3\text{U}$ ) au bout de 6 heures, ces souches ont une acidification très lente.

Dans Ce travail, les conditions de fermentations étaient les mêmes pour tous les souches, par conséquent, les différences des propriétés acidifiantes dépendent de la spécificité de chaque souche et des espèces comme été rapporté dans les études de **Badis et al (2004)** et **Xanthopoulos et al (2001)**.

Les résultats obtenus au bout de 6 premières heures ont montrées que les souches (S7, S16 et S8) appartenant au genre *Lactobacillus* sont de bonnes acidifiantes car leurs pH

situés entre 5,74 à 6,20 (**graphes C et E**) (ces souches peuvent être utilisées dans la fabrication de Lben), ces résultats sont en accord à celles rapportées par **Cogan et al (1975)**.

La technique de variations de pH ( $\Delta$  pH) et ( $\Delta$  A°D) permet de classer ces souches en fonction de leurs vitesses d'acidification au bout de 6 heures  $\Delta$  pH=0,4U à  $t \leq 3h$ , la souche a acidification rapide,  $\Delta$  pH=0,4U à  $3h \leq t \leq 5h$  souche acidification moyenne,  $\Delta$  pH=0,4U à  $t \geq 5h$  souche a acidification lente) dans cette base, à l'aide des **figures 06 et 07** nous remarquons que les souches (S6, S7 et S14) ont une vitesse d'acidification rapide car les valeurs de leurs  $\Delta$  pH  $\geq 0,4$  unité au bout des 3 heures premières seulement et les souches (S7,S8) ont l'acidité la plus grande au bout de 6h, ces résultats sont proches de celles obtenus par (**Desmazeaud et al., 1996 ; Durlu-Ozkaya et al., 2001**) qui ont constatés que la capacité d'utiliser le galactose et le glucose issus de lactose entraîne une importante production d'acide lactique. Alors que la plus faible acidité titrable (20°D) et la plus faible évolution de pH (pH=6,73) (**graphes A et B**) ont été observées chez la souche S17 (*Lactobacillus Plantarum*) qui peut offrir une possibilité d'effectuer des fermentations avec un caractère un peu moins acidulé ce qui est conforme avec les résultats de **Robert et al (2006)** et **Kandler et Weiss, (1986)**, qui ont montrés que les lactobacilles mésophiles hétérofermentaires ont un pouvoir acidifiant faible.

La conclusion globale de cette expérience nous permet de classer les souches (S2, S5, S6, S7, S8, S10 et S11) dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiantes (40°D<acidité<79°D) et le reste des souches dans la catégorie des bactéries faiblement acidifiantes (acidité<40°D) selon **Hassain (2013)**, ces résultats confirment ceux obtenus par **Kandler et weiss (1986)**.

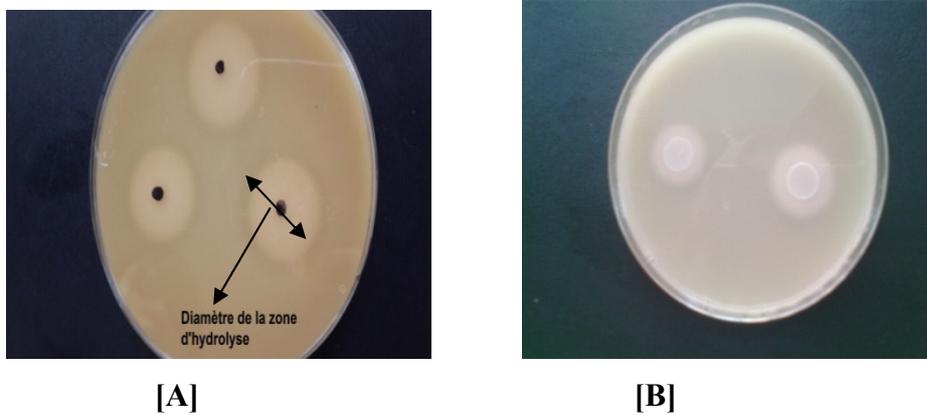
### **6.3. Pouvoir protéolytique :**

Les valeurs rapportées dans le **tableau V (Annexe VI)** et les **figures 08 et 09**, représentent les résultats d'hydrolyse des protéines par les souches bactériennes.

L'activité protéolytique est une propriété importante pour la culture secondaire, car elle peut influencer la saveur de produit en fournissant la plupart des précurseurs de l'arôme (**Yvon, 2006**). Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les souches hautement protéolytiques ne sont pas toujours les plus appropriées pour servir de ferments lactiques, depuis la protéolyse excessive peut provoquer la production incontrôlée de peptides amers et

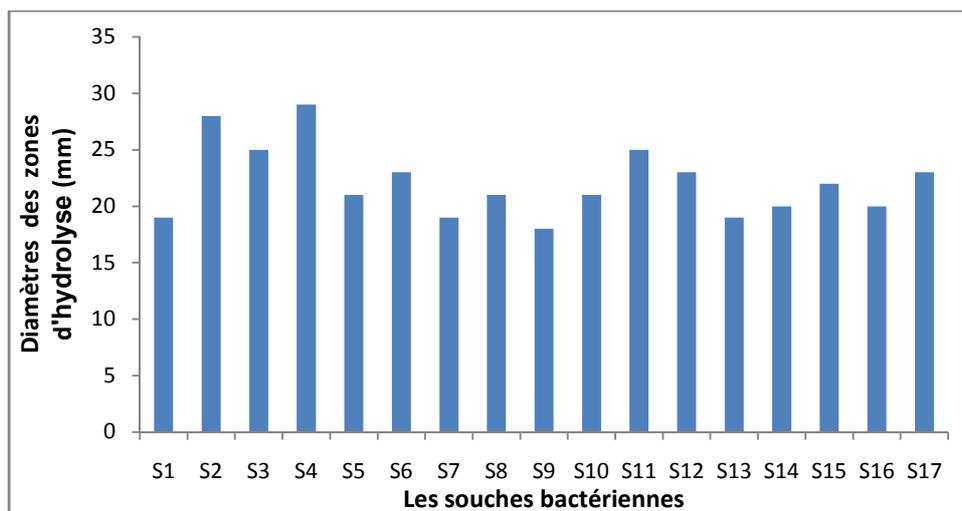
d'autres composées indésirables, voir hydrolyse de la caséine excessive résultant d'un produit finale trop mou (Buffa et al.,2005).

D'après les résultats de la mesure des diamètres des zones d'hydrolyse (les diamètres des spot sont inclus) , nous remarquons que les souches (S4,S2) sont fortement protéolytique avec des diamètres de 29mm et 28mm respectivement ,suivi de S11 avec un diamètre de 25mm , S6 présente un diamètre de 23mm ,alors que les souches (S7,S12 et S17) ont montrés des diamètres de 23mm, les souches (S5,S8,S10,S14,S15 et S16) présentent un diamètre compris entre 20mm et 22mm , comparativement à toutes ces souches, les souches ( S1,S7,S9 et S13) ont le diamètre le plus petit qui ce situe entre 18mm à 19mm .



**Figure 08:** Activité protéolytique sur milieu MRS au lait.

[A] : Quelques souches de Lactobacilles, [B] : Quelques souches de Leuconostoc.



**Figure 09:** les diamètres des zones d'hydrolyses des protéines sur gélose MRS additionné de lait écrémé.

Nous remarquons que les résultats obtenus sont en accord à ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont trouvés que les bactéries lactiques isolées de beurre présentent une activité protéolytique.

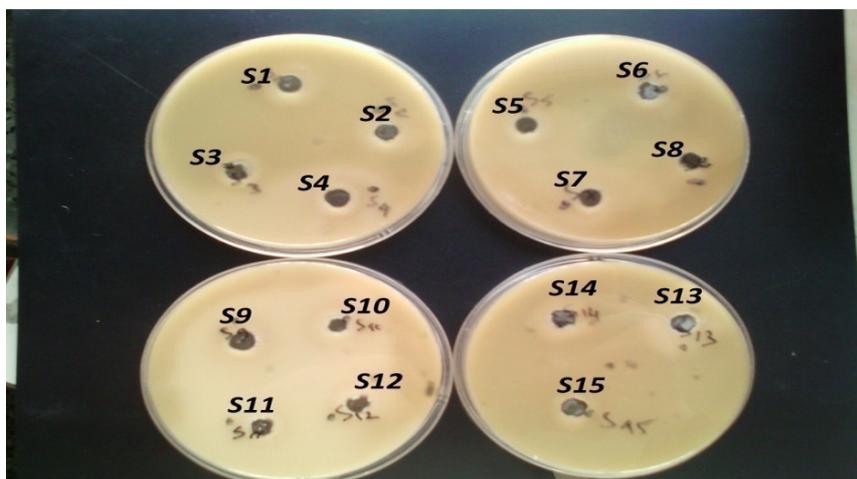
L'activité protéolytique dépend en partie de la composition chimique du milieu de culture (**Zadi-Karam, 1998 ; Drici, 2000 ; Hassaïne, 2013**). D'autres travaux ont montré aussi l'existence d'une relation directe entre l'expression de cette activité protéolytique et la composition du milieu de culture et particulièrement sa teneur en peptides libres (**Marugg et al., 1995 ; Meijer et al., 1996**).

Toutes les autres souches ont un pouvoir protéolytique, ces résultats nous permettant de confirmer d'une part le caractère protéolytique et d'autre part la présence d'une protéase de paroi, comme il a été rapporté par les travaux de (**Desmazeaud, 1990, sanni, et al .,2002**). Donc ces souches ont un intérêt très important dans l'industrie laitière exemple ( la production de yaourt)

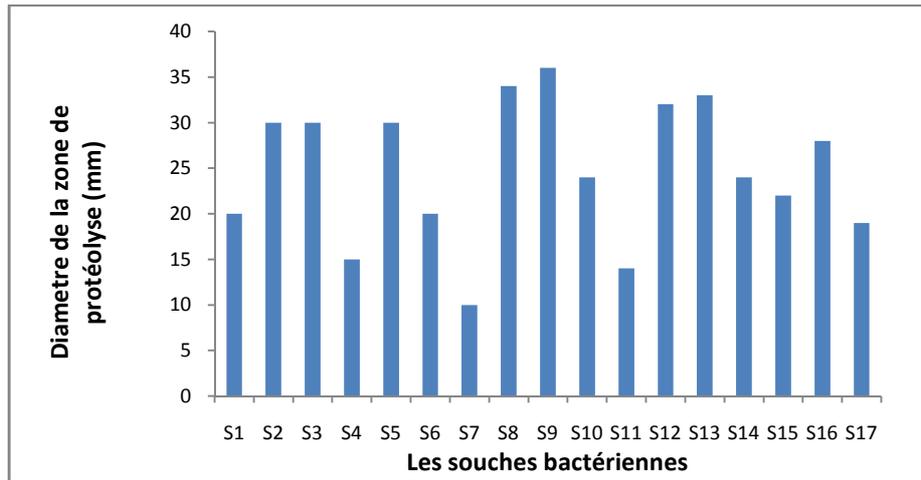
### **6.3.1. L'activité exoprotéasique :**

Toutes les souches étudiées présentent des zones de protéolyse autour des puits **tableau VI (Annexe VI) et figure 10**, ce qui montre la présence des enzymes exoprotéasiques.

Les résultats obtenus sont présenté dans les figures 11, nous remarquant que les souches (S9, S8) présente le diamètre le plus grand de la zone d'hydrolyse, allant de 34 à 36 mm, alors que la souche S7 présente le diamètre le plus faible (10 mm).



**Figure10:** Représentation de L'activité exoprotéasique



**Figure11:** Histogramme des diamètres de l'activité exoprotéasique.

Les résultats de l'activité exoprotéasique de nos souches se rassemble à celles trouvées par **Thapa et al (2006)** et **Pescuma et al (2010)**. Ces auteurs ont trouvés une activité protéasique assez importante chez les *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

### 6.3.2. L'activité endoprotéasique :

Pour étudier et caractériser les enzymes protéolytiques, les extraits enzymatiques des endoprotéases ont été récupérés.

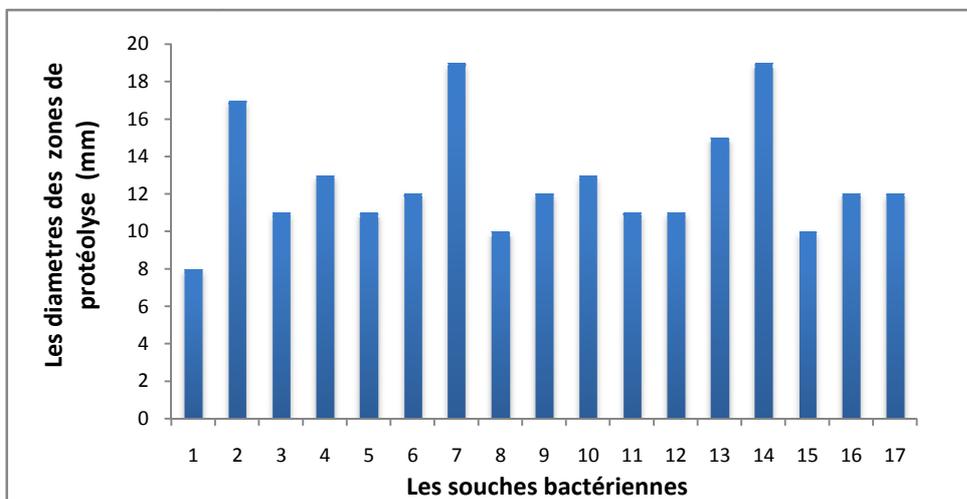
La **figure 12** représente l'apparition des zones de protéolyse autour des puits, ce qui indique l'existence des enzymes endoprotéasique et leurs capacités à hydrolyser les caséines de lait.



**Figure 12 :** Représentation de l'activité endoprotéasique.

Les résultats des diamètres des zones d'hydrolyse obtenus sont présentés dans la **figure 13**, nous remarquons que les souches (S2, S14 et S7) ont le diamètre le plus grand par

rapport aux reste des souches, Elles présentent des diamètres de 17, 19 et 19mm respectivement, alors que les autres souches présentent des diamètres varient entre 10mm à 15mm et la S1 a le diamètre le plus faible 8mm.



**Figure13:** Histogramme des diamètres de l'activité endoprotéasique

Si on compare les résultats obtenus de l'activité protéasique, nous pouvons constater que la meilleure activité est celle des enzymes exocellulaires. Ces résultats ne sont pas en concordance avec celles de **González et al (2010)** qui a trouvé que l'activité endoprotéasique est importante chez les bactéries lactiques.

#### **6.4. Pouvoir lipolytique:**

Après la réalisation de ce test et d'après les résultats obtenus **tableau VIII (Annexe VII)**, on constate que l'ensemble des souches ne présentent pas une activité lipolytique car aucune de ces souches présentent une zone d'hydrolyse autour des spots,(ces résultats ne sont pas en accord avec les travaux de **Mayers et al., 1996** qui ont montrées que les Lactobacilles présentent une activité lipolytique moyenne et les Leuconostoc étaient faiblement lipolytique, mais il existe une croissance bactérienne comme il est rapporté par les études de **Fernandez et al (2000)** qui ont montrées que la croissance des bactéries ne nécessite pas une activité ésterasique. A travers les différentes publication scientifiques, les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires (**Liu et al .,2001**).

### 6.5. Pouvoir aromatisant :

L'une des caractéristiques technologiques importante lors de fabrication et élaboration des produits laitiers fermentés est la production d'arôme.

Les résultats obtenus après la réalisation de ce test dans le lait et bouillon clark et lubs sont groupés dans le **tableau IX (Annexe VII)** et d'après la **figure14**, il apparaît que les souches (S3, S4, S7, S8, S9, S10, S12 et S13) ont un pouvoir aromatique car ils présentent un anneau rouge autour du tube après l'ajout de 2 réactifs (VP1, VP2).



**Figure 14** : Production d'arome par les bactéries lactiques.

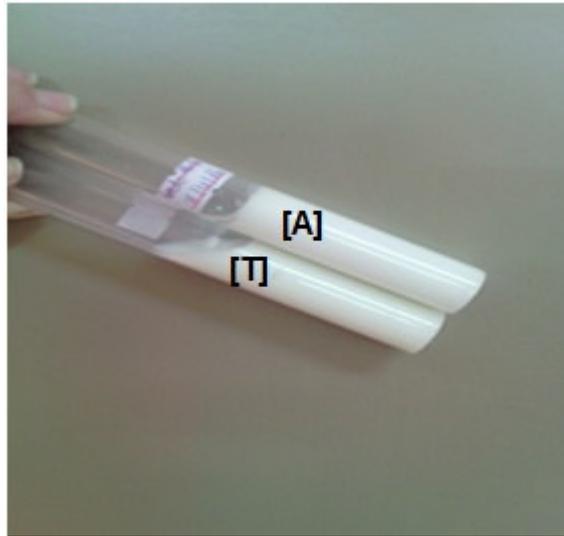
[T] : Témoin, [A] : Production d'arôme sur le milieu Clark et Lubs, [B] : Production d'arôme sur le lait.

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques à partir de différents substrats (pyruvate) qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés (**Raynaud et al., 2003 ; Cholet, 2006,**).

Huit souches parmi les dix sept souches étudiées ont la capacité à produire l'arôme mise en évidence sur le bouillon Clark et Lubs et le lait. Les souches (S1, S2) de genre *Leuconostoc* ne produisent pas de l'arôme ces résultats ne concordent pas ceux de **Cogan (1975)**, qui est constaté que la production de diacétyle et d'acétoïne est sans doute le caractère le plus utilisé par les *Leuconostoc*.

### 6.6. Pouvoir épaississant :

Les résultats de pouvoir épaississant sont résumés dans le **tableau X (Annexe VII)**, **la figure 15** montre l'aspect des gels formés après fermentation. Nous avons noté un aspect épais et dense des coagulums, la plupart de ces derniers, présentent une viscosité élevée.



**Figure 15 :** Aspect des gels formés sur lait saccharosé.

[T] : Témoin ; [A] : Aspect de gel.

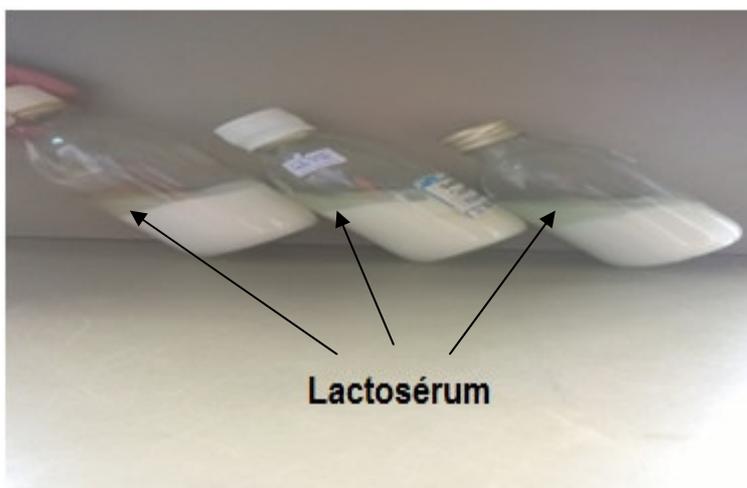
La majorité de ces souches présentent un aspect épais et visqueux due à l'accumulation des EPS comme il est rapporté par **Béal et al (2008)**, ces souches peuvent être servir à la production de yaourt et fromages. Cette viscosité est indépendante de la quantité d'EPS produite. D'après **Lin et Chien (2007)**, la production des EPS dépend des ferments lactiques et la durée de la fermentation.

### 6.7. Pouvoir coagulant :

Les résultats de ce test qui sont résumés dans le **tableau XI (Annexe VII)** ont montrés que la souche S4 donne le grand volume de lactosérum et présente un aspect coagulant et une odeur appréciable, les souches (S2,S11,S12,) présentent les volumes 59ml, 46ml et 35ml respectivement après 48h de croissance, avec une odeur appréciable, suivi de (S10,S6,S9,S15) qui ont des volumes varient entre 9ml à 26ml et tous présent l'odeur appréciable et les deux souches S3 et S13 présentent le lactosérum mais ya pas une bonne

séparation, alors que le reste des souches (S1,S5,S7,S14,S16 et S17) présentent une coagulation partielle du lait.

La **figure 16** présente l'aspect du gel après la coagulation du lait, figure montre clairement une bonne consistance du gel et une bonne séparation du lactosérum.



**Figure 16 :** Aspect de lait après la coagulation et formation de gel.

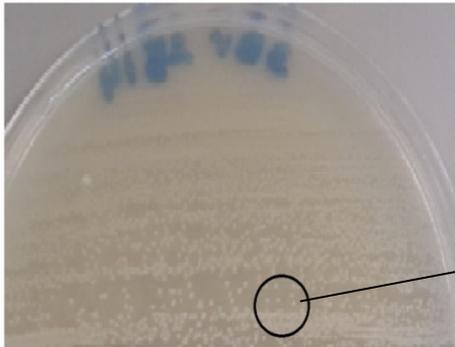
Les souches qui présentent une grande rétention du lactosérum (S4 et S2) présentent une forte coagulation du lait avec une odeur appréciable, ces souches peuvent être appropriées pour servir comme des ferments lactiques en technologie laitière (production de fromage, yaourt...etc.), comme il est rapporté par **Martely (1983)** qui a constaté que la sélection et l'utilisation des ferments lactiques sont basées sur leurs propriétés acidifiantes.

## **6.8. Les exopolysaccharides (EPS) :**

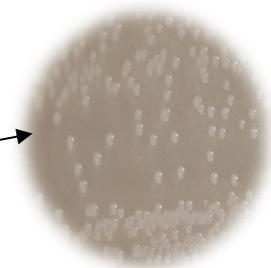
### **6.8.1. Test de production de dextrane :**

Les dix sept souches sont capables de dégrader le saccharose et produire le dextrane qui se traduit par l'apparition des colonies visqueuses et gluantes comme il est montré dans les **Figures 17 et 18** et le **Tableau XIII (Annexe VIII)**, Ce caractère est conforme à celui cité par (**Carr et al., 2002 ; Bjorkroth et al., 2006 ; Philippon et al., 2008 ; Ghazi et al., 2009**).

Les souches de genre *Leuconostoc* présentent des petites colonies bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose, ce qui a été montré par (Mayeux et Liker, 1962 ; Garve, 1984 ; Carr et al., 2002 ; Badis et al., 2005), Ces observations rejoignent aussi celles de (Cerning et al., 1991 ; Du vuyst et al., 2001) qui avaient constaté que les Lactobacilles sont capables de produire des EPS. Selon Walling et al (2001), la production des EPS par les bactéries lactiques est un caractère à intérêt industriel.



**Figure 17 :** Aspect des colonies sur gélose hypersaccharosée.

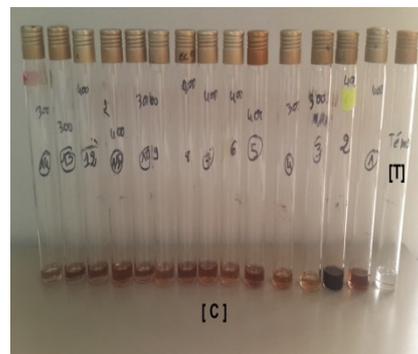
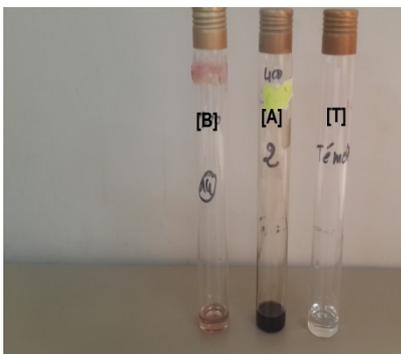


**Figure 18:** Aspect des colonies après l'agrandissement.

### 6.8.2. Quantification des exopolysaccharides (EPS) :

La quantification des EPS produits a porté sur les espèces présentant des résultats positifs sur la gélose hypersaccharosée. L'ensemble des résultats est illustré dans le **tableau XIII (Annexe VIII)**.

Ce test a montré que toutes les souches étudiées, présente une production d'un agent épaississant, les exopolysaccharides. **figure 19.**



**Figure 19:** production des EPS par des bactéries lactiques

[T] : Témoin ; [A] : Production forte d'EPS ; [B] : Production faible d'EPS

[C] : Production d'EPS par toutes les souches.

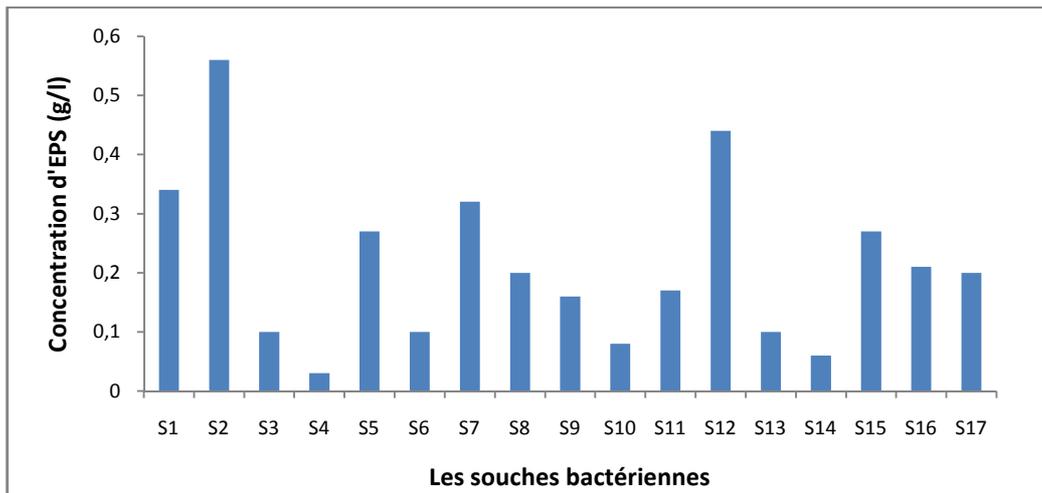


Figure 20: Histogramme de quantification des EPS

D'après les résultats de la quantification figures 19 et 20, on constate que les deux souches (S2, S12) présentent la plus grande quantité d'EPS par 0,56g/l et 0,44g/l, et les souches (S4, S10) présentent la plus faible quantité par 0,03g/l et 0,08g/l.

Le rendement final des EPS dépend de la composition du milieu (source de carbone, source d'azote et autres nutriments) et des paramètres de croissance (Température, pH, oxygène, temps d'incubation...etc) (Badel et al .,2011).

Les EPS des bactéries lactiques n'ayant pas de gout particulier, donnant une meilleure perception au gout (Hemme et al .,2004), une autre hypothèse physiologique montre que les EPS resteront plus longtemps dans le tractus gastro-intestinal et qui améliorera la colonisation par les bactéries probiotiques (German et al .,1999).

# Conclusion

Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers. Un intérêt industriel tout particulier a été porté pour ces bactéries, elles sont utilisées aussi pour améliorer des caractères organoleptiques de produit (le goût, la saveur, la texture, l'arome de produits par exemple le lait fermenté, le yaourt, le fromage, le pain et les produits carnés... etc.)

Au cours de cette étude, dix sept souches ont été ciblées (treize de genre *Lactobacillus* et quatre appartiennent au genre *Leuconostoc*) pour étudier leurs différentes caractéristiques morphologiques et principalement technologiques.

Généralement, les souches étudiées ont montré un pouvoir acidifiant remarquable, mais il existe des souches très acidifiantes (S7 et S8), cette acidité produite stimule la coagulation du lait et même, elle joue un rôle important dans la conservation des nombreux aliments.

Les résultats acquis après l'étude de l'activité protéolytique, ont permis de reconstituer que toutes les souches ont une bonne activité protéasique et présentent des enzymes protéolytiques, alors que aucune de ces souches ne présente une activité lipolytique.

Parmi les souches testées, il existe celles qui présentent une bonne rétention de lactosérum avec une bonne consistance du gel, et caractérisées par leurs capacités à produire des composés aromatiques.

La production de dextrane utilisée pour la texturation de compositions alimentaires est une qualité technologique importante, ce caractère est présent chez les souches étudiées.

Les résultats obtenus dans cette étude, nous permettent de proposer ces principales perspectives :

- Etude des profils biotechnologiques, tels que l'activité acidifiante, protéolytique, lipolytique et aromatisante, ainsi que la production des exopolysaccharides en utilisant des techniques plus approfondies.
- Etude des cinétiques de croissance de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* qui forment entre eux une coopération, et qui peuvent être utilisés en industrie laitière.

# **Références bibliographiques**

- ◆ **Atlan D, Béal C, Champonier-Vergès MC, Chapot-Chartier MP, Chouayekh H, Cocaign- Bousquet M, Deghorain M, Gadu P, Gilbert C, Goffin P, Guédon E, Guillouard I, Guzzo J, Juillard V, Ladero V, Lindley N, Lortal S, Loubière P, Maguin E, Monnet C, Monnet V, Rul F, Tourdot-Maréchal R. et Yvon M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G et Luquet FM). Tec & Doc.Lavoisier. Paris, 271-447.
- ◆ **Axelsson L. (2004).**Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S, Wright AV et Ouwehand A). 3e Ed : Marcel Dekker, Inc. NewYork. 1-66.
- ◆ **Badel S, Bernardi T, et Michaud P. (2001).** New perspectives for *Lacobacilli* exopolysaccharides. Biotechnology Advances, 29, 54-66.
- ◆ **Badis A, Guetarni D, Moussa BB, Henni DE et Kihal M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21, 579-588.
- ◆ **Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». Sciences et technologie. 23, 30-37.
- ◆ **Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F et Obert JP. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Carrieu G et Luquet FM). Tec & Doc. Lavoisier, Paris , 1-144.
- ◆ **Bekhouché et Boulahrouf. (2005).** Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. Science technologique. C N° 23, 38-47.
- ◆ **Bjorkroth J, Holzapfel WH. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* In: The Prokaryotes. Springer .vol 4: 273-286.
- ◆ **Bourgeois CM et Larpent JP. (1996).** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 432-704.
- ◆ **Budde BB., Hornbæk T, Jacobsen T, Barkholt V, Koch AG. (2003).** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for

vacuum-packed meats, culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments International Journal of Food Microbiology. vol 83: 171-184 .

- ◆ **Buffa M, Morais J, Jiménez-Belenguer A, HerdIndez-Giménez E et Guamis B. (2005).** Technological characterization of lactic acide bacteria isolated from raw ewe's milk for cheese making. *Milchwissenschaft*. 61, 404-407.
- ◆ **Carr FJ, Hill D, Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281-370.
- ◆ **Cheriguene A, Chougrani F et Bensoltane A. (2006).** Identification and caracterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7): 1242-1249.
- ◆ **Chenoll E, Macian MC, Aznar R. (2003).** Identification of *Carnobacterium Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based technique. *Systematic and Applied Microbiology*. vol 26 : 546-556
- ◆ **Cholet O, (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- ◆ **Cogan TM. (1975).** Citrateutilization milk by *Leuconostoc cremoris* and *Streptococcus diacetilactis*. *J. Dairy Res.* 42, 139-146.
- ◆ **Collins Md, Samelis J, Metaxopoulos J et Wallbanks S. (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages, decription of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species .*J. Appl. Bacteriol*vol. 75, 595-603.
- ◆ **Delgado A, Dulce B, Pedro F, Cidalia PJ et Figueiredo M. (2001).** Antomicrobiol activity of *L. plantorum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives laits.81, 203-215.
- ◆ **Dellaglio FH, de Roissard, S Torriani, MC Curk et D Janssens . (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans défirent bactéries lactiques.. H. De Roissard et F.M.Luquet(ed). *Lorica ,Uriage*. vol 1 : 25 -116.
- ◆ **de Roissart, H et Luquet , FM. (1994).**Bactéries lactiques, I et II ; *Lorica* (Chemin de Saint Georges), F38410, France.

- ◆ **Desmazeaud MJ. (1990).** Le lait milieu de culture. Microbiologie-Aliment-nutrition. 8, 313-325.
- ◆ **Desmazeaud M. (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Cahier agricultures. 5, 331-343.
- ◆ **De Vuyst LF, De Vin F, Vaningelgem et B.Degeest. (2001).** Recent development in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 11, 687-707.
- ◆ **Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T et Shaha NP. (2007).** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. 86, 21-38.
- ◆ **Drici H. (2001).** Etude biochimique de la protéolyse chez *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* et recherche du support génétique des protéases. Thèse de Magister : Université d'Oran-Sénia.
- ◆ **Drouault, S et Corthier G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés.
- ◆ **Durlu-Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tinail N et Lipoulou-Tzanetaki E. (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. Journal Applied Microbiology. 91, 861-870.
- ◆ **Edwards CG, Collins MD, Lawson PA, Rodriguez AV. (2000).** *Lactobacillus nagelii* ssp. Nov., an organism isolated from a partially fermented wine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol 50: 699-702.
- ◆ **EOM H, SEO DM, HAN NS. (2007).** Selection of psychotrophic *Leuconostoc spp.* Producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. International Journal of Food Microbiology. vol 117: 61-67.
- ◆ **Fernandez L, Beerthuyzen MM, Brown J, Coolbear T, Holland R et Kuipers OP. (2000).** Cloning, Characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. App. Env. Microbiol. 66, 1360-1368.
- ◆ **Figueiredo AR, Campos F, De Freitas V, Hogg T, Couto JA . (2008).** Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* .Food Microbiology. vol 25: 105-112.

- ◆ **Ganzele G, Michael, Alexndra Holtzel, Jens Walter, Gunther Jung, Et Walter P, Hammes. (2000).** Characterization of Rentericyclin Productet By *Lactobacillus Reuter Lth* 2584. Appl And environ, Microbiol. 4325-4333.
- ◆ **Garvie EI. (1984).** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiaton of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. Methods Microbiol. 16, 147-178.
- ◆ **German B, Schiffrin EJ. Renerio R, Mollet B, Pfeifer A et Neese JR. (1999).** The development of functional foods. Lessons from the gut. Trends in Biotechnology. 17, 492-499.
- ◆ **Gerrit S, Bart AS et Wim JME. (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS. Microbiol. Rev. 29: 591-610.
- ◆ **Ghazi F, Hienni DE, Benmchernene Z, Kihal M. (2009).** Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for identification of Dominants Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. World Journal of Dairy & Food Sciences 4 (1): 78-87.
- ◆ **González L, Sacristán N, Arenas R, Fresno JM et Tornadijo ME. (2010).** Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. Food Microbiol. 27, 592-597.
- ◆ **Guiraud JP. (1998).** Microbiologie alimentaire. 1e Ed.. Dunod, Paris, 136-144.
- ◆ **Guiraud ,JP. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod-RIA., 696.
- ◆ **Hassaine O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de Doctorat en Biotechnologie. Université d'oran-Essenia, 57-102.
- ◆ **Hemme D, Foucaud-Scheunemann C. (2004).** *Leuconostoc*, Characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy. 467-494.
- ◆ **Hikmate A, Benour N, Antonio C, Caballero N, Miguel AFF,Prévez-Pulido R, Galvez A. (2012).** Characterization of lactic bacteria from naturally fermented Manzanilla Alorena gveen table olives. Food Microbiology. 32, 308-316.
- ◆ **Ho TNT, N Tuan N, Deschamps A et Caubet R. (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.

- ◆ **Holt J G, Krieg N, R, Sneath PH, Staley JT and Williams S T. (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>ème</sup> Edition , William & Wilkins, Baltimore.
- ◆ **Hu P, Zhou G, Xu X, Li C, Han Y. (2009).** Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. Food Control. vol. 20: 99-104.
- ◆ **Idoui T et Karam NE. (2008) .** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. Gr. Y. Aceites. 59(4): 361-367.
- ◆ **Kandler O et Weiss N. (1986).** Genus *Lactbacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In: Sneath, PHA, Mair NS, Sharpe ME et Holt JG (Eds).
- ◆ **Khedid K, Faid M, Mokhtari A, Soulaymani A et Zinedine A. (2007).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiological Research. 164, 81-91.
- ◆ **Kihal M, Prevost H, Lhotte ME, Huang DQ, Diviès C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc* .J. Appl. Microbiol. 22, 219-223.
- ◆ **Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of food Microbiology vol 41: 103-125.
- ◆ **Krieg NR. (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria-Identification of procaryotes. In Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Garrity GM., Boone DR., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore. 721, 33 -38.
- ◆ **Labaoui H, Elmoualdi L, El yahiaoui M et Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches des bactéries lactiques antibactérienne. Bal doc Dparm. Bordeaux, 144, 237-250.
- ◆ **Larpent ,J.P et Larpent, G M. (1990).** Mémento technique de microbiologie 2<sup>ème</sup> Ed. Technique et documentaire .Lavoisier, Paris.417.
- ◆ **Leroy F et De Vuyst L, (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Tre.FoodSci. Technol. 15, 67-78.
- ◆ **Leveau JY, Boiux M et De Roissart HB. (1991).** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 3, 2-40.
- ◆ **Lin TY et Chien MFC. (2007).** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food. Chem. 100, 1419-1423.

- ◆ **Limsowtin GKY, Powell IB, Porente E. (1996).** Type of starters. In: cogan,T.,Accolas, JP (Eds.), Dairy starters cultures. VCH publishers, Inc. New York. 101-129.
- ◆ **Liu SQ, Holland R, Crow VL. (2001).** Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. International Dairy Journal, vol 11: 27-35.
- ◆ **Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman W B. (2008).** Bergey's taxonomic outlines-Revised Road Map to the Phylum Firmicutes.Vol.3.Disponible sur [http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys\\_Vol\\_3\\_Outline.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf)
- ◆ **Luquet FM et Corrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 3-37.
- ◆ **Martley FG. (1983).** Temperature sensitivities of thermophilic starter strains. New zeal J. Dairy Sci. Technol. 18, 191-196.
- ◆ **Marugg JD, Meijer W, Van Kranenburg R, Laverman P, Uineberg BR, De Vos WM. (1995).** Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis* : Control of transcription initiation by specific dipeptides. J Bacteriol. vol 177: 2982-2989.
- ◆ **Mayeux J, Sandine W, Elliker P. (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain cultures. J. Dairy Sci. 45, 655-656.
- ◆ **Mäyrä-Mäkinen A et Bigret M. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York, 73-102.
- ◆ **Meijer WC, Marrug JD, Hugenholtz J. (1996).** Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. vol 62: 156-161.
- ◆ **Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 512-592.
- ◆ **Mozzi F, Torino MI et Valdez G.F. (2001).** Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. 14: Food Microbiol. Protocols. Humana Press. Totowa. 183-190.
- ◆ **Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F. et de Valdez G.F. (2010).** Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 141, 73-81.

- ◆ **Philippon A et Poyart C. (2008).** Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical: *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. EMC Elsevier Masson SAS. Biologie clinique. 90-05-0120. 1-11.
- ◆ **Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 1-106.
- ◆ **Prescott LM, JP Harley et DA Klein. (2003).** Les bactéries lactiques : les Gram –positif pauvres en GC. Dans : microbiologie, 2<sup>ème</sup> éd.francaise.Prescott, L.M.,M-P-Harley,D.A. Klein (eds). De Book Université,Bruxelles,Belgique.,5A-535.
- ◆ **Raynaud S, Perrin R, Coccagn-Bousquet M et Loubière P. (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis subsp.lactis* biovar diacetylactis in response to auto acidification and temperature downshift in skim milk. App. Env. Microbiol. 71(12), 8016-8023.
- ◆ **Robert H, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y et Fontagne-Faucher C. (2006).** Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. LWT 39, 256-265.
- ◆ **Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. (2005).** Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains, taxonomic implications. Int J Syst Evol Microbiol., vol: 55, 197-207.
- ◆ **Rodriguez JM, Martínez MI, Horn N et Dodd HM. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80, 101-116.
- ◆ **Roudj S, Belkheir K, Zadi-Karam H et Karam NE. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* 34 (2): 218-227.
- ◆ **Sanchez JI, Martinez B, Guillen R, Jimenez DR et Rodriguez A. (2006).** Culture conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS 26. App. Environm. Micro. vol 72(12): 7495-7502.
- ◆ **Sanni AI, Morlon-Guyoy J et Guyot JP. (2002).** New efficient amylase producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L.fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. International Journal of Food Microbiology. 72, 53-62.
- ◆ **Serhan M, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles AM, Hosri C et Fanni J.(2009).** Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26, 645-652.

- ◆ **Stackebrandt, E , et GOEBEL, B M. (1994).** Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849.
- ◆ **Stiles ME et Holzapfel WH. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
- ◆ **Streit F, Corrieu G et Béal C. (2007).** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* 128, 659-667.
- ◆ **Tailliez,P . (2001).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il ya près de 3 milliards d'années. *Lait.* 81, 1-11.
- ◆ **Thapa N, Pal J et Tamang J.P. (2006).** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 33-38.
- ◆ **Vandamme P, Pot B, Gillis M, DeVos P, Kersters K et Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407.
- ◆ **V.Xanthopoulos D, Petridis N, Tzanetakis. (2001).** Characterization and Classification of *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Delbruckii Subsp. Bulgaricus* Strains Isolated from Traditional Greek Yoyurts. *Journal of Food Science.* 1365-2621.
- ◆ **Walling EG, Indreau E et Lonvaud-Funel A. (2001).** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. *INRA.* 289-300.
- ◆ **Wu MH, Pan TM, Wu YJ, Chang SJ, Chang MS, et Hu CY. (2010).** Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 1-7.
- ◆ **Yvon M. (2006).** Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal Dairy Technology.* 61, 16-24.
- ◆ **Zadi-Karam H. (1998).** Bactéries lactiques de lait *Camelus Dromedarius* : Étude microbiologique et biochimie, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'État. Université de Constantine. Algérie, 205.

# **Annexes**

**Annexe I:** Composition des milieux de culture.➤ **Milieux solides :****1. Gélose MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960) :**


---

Extrait de levure .....	5g
Extrait de viande .....	5g
Peptone .....	10 g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium .....	2g
Glucose .....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.1g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05 g
Agar.....	12g
Tween80 .....	1 ml
Eau distillée q.s.p .....	1000 ml

pH= 6.5±0.2 à 37°C

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

**2. Milieu hypersaccharosée**


---

Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	3g
Peptone .....	2.5g
Saccharose .....	150g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
NaCl.....	1g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.2g
Agar .....	15g
Eau distillée qsp .....	1000ml

pH= 6,8

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

## ➤ Milieux liquides :

▪ **MRS –Bouillon (pH = 6.2)**

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	.8g
Extrait de levure .....	4g
Glucose .....	20g
Acétate de sodium trihydraté .....	5,0 g
Citrate d'ammonium .....	2,0 g
Tween 80 .....	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium .....	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté .....	0,05 g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

▪ **Clark et Lubs**

Peptone tryptique ou poly peptone .....	5 – 7 g
Glucose .....	5 g
Phosphate dipotassique .....	5 g
Eau distillée q.s.p .....	1000 ml

pH =7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

**Annexe II:** Les colorants.▪ **Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane .....	10g (ou 5g)
Phénol .....	20g
Ethanol à 0.95 .....	100 cm <sup>3</sup>
Eau distillée .....	1 dm <sup>3</sup>

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est ajoutée ensuite.

▪ **Lugol**

Iode .....	5g
IO dure de potassium .....	10g
Eau distillée qsp .....	1g
Flacon brun	

▪ **Fuchsine de Ziehl**

Fuchsine bosique .....	10g
Phénol .....	50g
Ethanol à 0.5.....	10cm <sup>3</sup>
Eau distillée .....	1dm <sup>3</sup>

**Annexe III** : Coloration de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à l'objectif (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

## Annexe IV

Tableau I : Résultats de la standardisation

souche	Code des souches	Concentration bactérienne (UFC/ml)
LN 12Lb	S1	$1,2 \times 10^{10}$
LN 18Br	S2	$3,2 \times 10^{10}$
LN 7Br	S3	$1,5 \times 10^{10}$
LN 3Lb	S4	$2,1 \times 10^{10}$
Lacto 9Br	S5	$1,04 \times 10^{10}$
Lacto 3Br	S6	$1,34 \times 10^{10}$
Lacto 7Br	S7	$1,29 \times 10^{11}$
Lacto 16Lb	S8	$1,02 \times 10^{10}$
Lacto 16Lb <sub>1</sub>	S9	$1,55 \times 10^{10}$
Lacto 16Lb <sub>2</sub>	S10	$1,23 \times 10^{10}$
Lacto 6Lb	S11	$2 \times 10^{10}$
Lacto 15Br	S12	$1,07 \times 10^{10}$
Lacto 10Lb	S13	$1,39 \times 10^{11}$
Lacto 13Br	S14	$4,98 \times 10^{10}$
Lacto 8Lb1	S15	$1,5 \times 10^{10}$
Lacto 12Lb	S16	$1,05 \times 10^{10}$
<i>Lb platarum</i>	S17	$0,9 \times 10^{10}$

**Tableau II:** Résultats de test catalase, coloration de Gram et aspect microscopiques des souches.

<b>souches</b>	<b>Coloration de Gram</b>	<b>forme</b>	<b>regroupement</b>	<b>Test de catalase</b>
<b>S1</b>	+	cocci	Bien distingué	-
<b>S2</b>	+	Bacille court	chainette	-
<b>S3</b>	+	Cocci allongé	chainette/isolé	-
<b>S4</b>	+	bacille	chainette	-
<b>S5</b>	+	cocobacille	chainette	-
<b>S6</b>	+	cocobacille	Chainette/isolé	-
<b>S7</b>	+	bacille	Chainette/diplocoque	-
<b>S8</b>	+	bacille	Chainette	-
<b>S9</b>	+	bacille	Chainette/diplocoque	-
<b>S10</b>	+	bacille	chainette	-
<b>S11</b>	+	Petit bacille	Chainette/isolé	-
<b>S12</b>	+	Bacille long	chainette	-
<b>S13</b>	+	Bacille long	chainette	-
<b>S14</b>	+	bacille	chainette	-
<b>S15</b>	+	bacille	chainette	-
<b>S16</b>	+	cocobacille	chainette	-
<b>S17</b>	+	bacille	chainette	-

(-) négatif ; (+) positif

## Annexe V

Tableau III : Résultats de l'évolution de pH et de l'acidité Dornic en fonction du temps.

	t=0h		t=2h		t=4h		t=6h		t=8h		t=24h		t=48h	
	pH	A°D	pH	A°D	pH	A°D								
<b>S1</b>	7,19	15	6,98	16	6,82	16	6,79	17	6,7	19	6,54	26	5,64	41
<b>S2</b>	7,05	15	6,96	15	6,87	17	6,73	18	5,55	45	5,40	48	5,20	51
<b>S3</b>	7,06	16	6,94	17	6,89	18	6,71	19	6,1	30	5,79	35	5,98	33
<b>S4</b>	7,07	16	6,89	16	6,85	19	6,80	19	6,11	19	6,09	25	6,00	25
<b>S5</b>	7,03	16	6,61	27	6,42	28	6,24	30	6,40	28	5,08	40	5,11	38
<b>S6</b>	7,00	18	6,74	20	6,71	21	6,60	22	6,68	22	5,21	54	4,59	63
<b>S7</b>	7,01	22	6,72	28	6,22	28	5,74	44	5,80	38	5,01	48	4,82	61
<b>S8</b>	6,80	25	6,74	36	6,65	38	6,20	40	5,27	58	4,37	66	3,80	72
<b>S9</b>	6,83	21	6,57	23	6,47	24	6,38	25	6,40	25	5,03	39	5,24	37
<b>S10</b>	6,97	20	6,72	21	6,70	21	6,56	23	6,12	28	5,29	54	4,72	62
<b>S11</b>	7,04	15	6,55	21	6,41	25	6,39	25	5,85	39	4,5	59	3,92	78
<b>S12</b>	7,01	23	6,72	26	6,57	27	6,44	29	6,69	25	5,36	35	5,31	37
<b>S13</b>	6,77	15	6,49	20	6,40	21	6,32	21	6,67	20	6,10	37	5,45	48
<b>S14</b>	7,03	19	6,79	20	6,77	21	6,6	21	6,65	20	5,79	32	5,06	41
<b>S15</b>	6,78	20	6,75	21	6,61	23	6,57	23	6,52	21	6,30	30	5,69	39
<b>S16</b>	7,01	21	6,72	25	6,53	26	6,20	29	5,84	33	5,50	38	5,46	39
<b>S17</b>	7,02	12	6,86	16	6,80	19	6,73	20	6,70	18	6,50	18	5,73	41

Tableau IV : Représentation de  $\Delta$  pH et  $\Delta$  acidité ( $D^\circ$ ) des souches.

Souche	$\Delta$ pH			$\Delta AD^\circ$		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h
S1	0,75	0,86	0,91	0,1	0,1	0,2
S2	0,32	0,69	1,08	0	0,2	0,3
S3	0,29	0,31	0,79	0,1	0,2	0,3
S4	0,22	0,41	0,68	0	0,3	0,3
S5	0,42	0,61	0,79	1,1	1,2	1,4
S6	0,26	0,29	0,4	0,2	0,3	0,4
S7	0,29	0,79	1,27	0,6	0,6	2,2
S8	0,06	0,15	0,6	1,1	1,3	1,5
S9	0,26	0,36	0,45	0,2	0,3	0,4
S10	0,22	0,27	0,41	0,1	0,1	0,3
S11	0,49	0,63	0,65	0,6	1	1
S12	0,29	0,44	0,57	0,3	0,4	0,6
S13	0,28	0,37	0,45	0,5	0,6	0,6
S14	0,24	0,26	0,43	0,1	0,2	0,2
S15	0,03	0,17	0,21	0,1	0,3	0,3
S16	0,15	0,48	0,81	0,4	0,5	0,7
S17	0,16	0,22	0,29	0,4	0,7	0,8

**Annexe VI****Tableau V** : Représentation des résultats de l'activité protéolytique.

<b>Souches</b>	<b>Les Diamètres des zones de protéolyse (mm)</b>
<b>S1</b>	19
<b>S2</b>	28
<b>S3</b>	25
<b>S4</b>	29
<b>S5</b>	21
<b>S6</b>	23
<b>S7</b>	19
<b>S8</b>	21
<b>S9</b>	18
<b>S10</b>	21
<b>S11</b>	25
<b>S12</b>	23
<b>S13</b>	19
<b>S14</b>	20
<b>S15</b>	22
<b>S16</b>	20
<b>S17</b>	23

**Tableau VI:** Représentations des résultats de l'activité exoprotéasique.

<b>souches</b>	<b>Les Diamètres des zones de protéolyse (mm)</b>
<b>S1</b>	20
<b>S2</b>	30
<b>S3</b>	30
<b>S4</b>	15
<b>S5</b>	30
<b>S6</b>	20
<b>S7</b>	10
<b>S8</b>	34
<b>S9</b>	36
<b>S10</b>	24
<b>S11</b>	14
<b>S12</b>	32
<b>S13</b>	33
<b>S14</b>	24
<b>S15</b>	22
<b>S16</b>	28
<b>S17</b>	19

**Tableau VII** : Représentations des résultats de l'activité endoprotéasique.

<b>souches</b>	<b>Les Diamètres des zones de protéolyse (mm)</b>
<b>S1</b>	8
<b>S2</b>	17
<b>S3</b>	11
<b>S4</b>	13
<b>S5</b>	11
<b>S6</b>	12
<b>S7</b>	19
<b>S8</b>	10
<b>S9</b>	12
<b>S10</b>	13
<b>S11</b>	11
<b>S12</b>	11
<b>S13</b>	15
<b>S14</b>	19
<b>S15</b>	10
<b>S16</b>	12
<b>S17</b>	12

**Annexe VII****Tableau VIII:** Représentation des résultants de l'activité lipolytique.

<b>souches</b>	<b>croissance</b>	<b>Activité lipolytique</b>
<b>S1</b>	+	-
<b>S2</b>	+	-
<b>S3</b>	+	-
<b>S4</b>	+	-
<b>S5</b>	+	-
<b>S6</b>	+	-
<b>S7</b>	+	-
<b>S8</b>	+	-
<b>S9</b>	+	-
<b>S10</b>	+	-
<b>S11</b>	+	-
<b>S12</b>	+	-
<b>S13</b>	+	-
<b>S14</b>	+	-
<b>S15</b>	+	-
<b>S16</b>	+	-
<b>S17</b>	+	-

(+) : croissance bactérienne ; (-) : pas de zone d'hydrolyse.

Tableau IX : Représentation des résultats de pouvoir aromatisant.

souches	Milieu clark et lubs	Lait écrémé stérile
S1	-	-
S2	-	-
S3	+	-
S4	+	-
S5	-	-
S6	-	-
S7	+++	-
S8	-	+++
S9	++	+
S10	+	-
S11	-	-
S12	+	-
S13	+	-
S14	-	-
S15	-	-
S16	-	-
S17	-	-

Négative (-) : absence de l'anneau rouge.      Positif (+) : présence de l'anneau rouge.

**Tableau X** : Représentation des résultats de pouvoir épaississant.

<b>souches</b>	<b>Aspect de coagulum</b>
<b>S1</b>	+++
<b>S2</b>	+++ et gazogène
<b>S3</b>	+++
<b>S4</b>	+++
<b>S5</b>	+++
<b>S6</b>	+++
<b>S7</b>	+
<b>S8</b>	+++
<b>S9</b>	+++
<b>S10</b>	+++
<b>S11</b>	++ et gazogène
<b>S12</b>	+++
<b>S13</b>	+++
<b>S14</b>	+
<b>S15</b>	++
<b>S16</b>	+
<b>S17</b>	+++

- (+) léger coagulation
- (++) moyenne coagulation
- (+++) aspect épais

**Tableau XI:** Représentation des résultats de pouvoir coagulant.

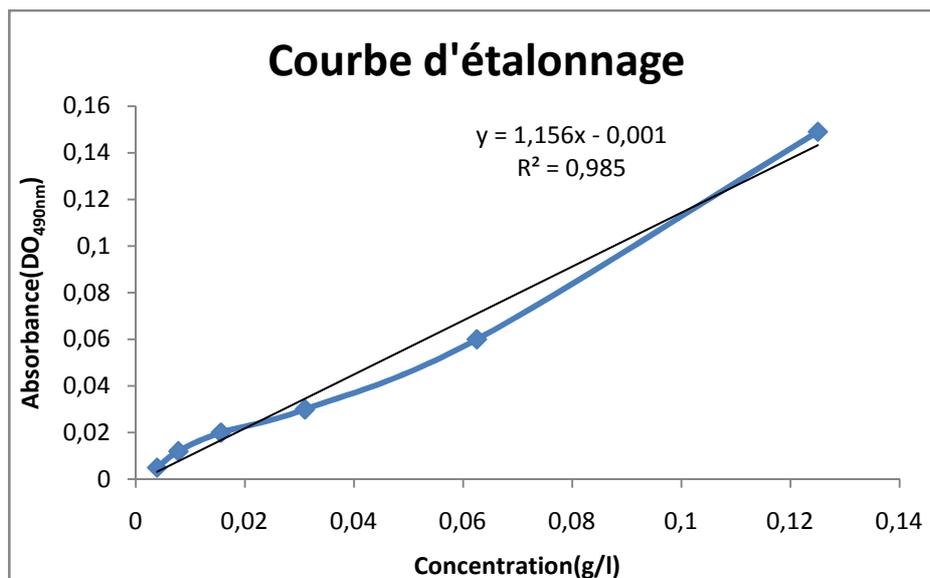
<b>souches</b>	<b>Volume de lactosérum</b>	<b>Odeur appréciable</b>
<b>S1</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S2</b>	59 ml	+
<b>S3</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S4</b>	71 ml	+
<b>S5</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S6</b>	24 ml	+
<b>S7</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S8</b>	9 ml	+
<b>S9</b>	17 ml	+
<b>S10</b>	26 ml	+
<b>S11</b>	46 ml	+
<b>S12</b>	35 ml	+
<b>S13</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S14</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S15</b>	14 ml	+
<b>S16</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	
<b>S17</b>	Présence de lactosérum ; pas de bonne séparation	

-Positive(+) : odeur appréciable.

## Annexe VIII

**Tableau XII:** La concentration et l'absorbance de différentes dilutions de la solution glucose.

La dilution	La concentration	L'absorbance(DO <sub>490nm</sub> )
1/2	0,125	0,149
1/4	0,0625	0,06
1/8	0,031	0,03
1/16	0,0156	0,02
1/32	0,0078	0,012
1/64	0,0039	0,005



**Figure 21 :** Courbe d'étalonnage du glucose.

Tableau XIII : Représentation des résultats de la quantification des EPS.

souches	Evaluation de test	absorbance	Concentration (g/l)
S1	+	0.390	0,34
S2	+	0.650	0,56
S3	+	0.109	0,1
S4	+	0.039	0,03
S5	+	0.306	0,27
S6	+	0.116	0,1
S7	+	0.364	0,32
S8	+	0.232	0,2
S9	+	0.179	0,16
S10	+	0.095	0,08
S11	+	0.190	0,17
S12	+	0.506	0,44
S13	+	0.115	0,1
S14	+	0.066	0,06
S15	+	0.310	0,27
S16	+	0.242	0,21
S17	+	0.234	0,2

(+) : Formation des colonies bombées sur la gélose hypersaccharosée.

## **Annexe IX**

### **Appareillage :**

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Agitateur électrique (VELP) ;
- Autoclave (SIHAVX Electronic) ;
- Bain Marie (GFL) ;
- Balance (RADWAG) ;
- Centrifugeuse(SIGMA) ;
- Etuves (Incucell) ;
- Four Pasteur (memmet) ;
- Micropipettes (Microlit) ;
- pH mètre (BOECO) ;
- Réfrigérateur (Condor) ;
- Spectrophotomètre (UV Shimadzu, Jasco UV630) ;
- Vortex électrique (MS2 Minishaker).
- Microscope optique (Zeiss)

**Résumé :**

L'étude réalisée a conduit à la revivification de dix sept souches de bactéries lactiques qui sont déjà isolées à partir de beurre et de lben de la région de Bejaia. La majorité sont des bacilles appartenant au genre *Lactobacillus* (76,47%), et il ya aussi des coques appartenant au *Leuconostoc* (23,53%).

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches présentent un pouvoir acidifiant remarquable, 58,8% de ces souches présentent une bonne acidification et seulement 17,64% qui présentent une faible acidification.

La détermination de l'activité protéolytique montre que 64,71% des souches ont une bonne activité.

Ces souches révèlent de bonnes propriétés fonctionnelles (texturante, aromatisante, coagulante et épaississante) qui peuvent être exploitées dans l'industrie laitière.

**Mots clés :** Revivification, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, acidification, activité protéolytique, aptitudes technologiques.

**Abstract :**

The study carried has permit the revivification of seventeen strains of lactic acid bacteria that are already isolated from lben and better of the region of Bejaia. The majority are bacilli belonging to the genus *Lactobacillus* (64,47%), and there are also cocci belonging to *Leuconostoc* (23,53%).

The results of the evaluation of technological traits indicate that all strains present a remarkable acidification 58,8% and only 17,64% present a weak acidification.

The determination of proteolytic activity showed that 64,71% of strains have good activity.

These strains revealed interesting functional ( thickening, aromatizing, coagulant) which can be utilized in the dairy industry.

**Key words:** Revivification, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, acidification, proteolytic activity, technological aptitudes.