

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-Harrach Alger
En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Agronomie
Option : Sciences Alimentaires

Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyl)

Présenté par :

Mme GHOZLANE née BENAZZOUZ Djamila

BELLAL M.M. Professeur, ENSA, Alger, (Promoteur)

28-06-2012

YAKHLEF H. Professeur, ENSA, Alger, (Président) MEKIMENE L. Maître de conférences, ENSA, Alger, (Examineur) NOUANI A. Maître de conférences, U. BOUMERDES (Examineur)

Table des matières

Dédicace . . .	5
REMERCIEMENTS . . .	6
Résumé . . .	7
Abstract . . .	8
ص خ لم . . .	9
Liste des abréviations . . .	10
Introduction . . .	11
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	13
I. Les bactéries lactiques : Généralités . . .	13
I.1. Découverte des bactéries lactiques . . .	13
I.2. Caractéristiques générales . . .	13
I.3. Description et utilisation . . .	14
I.4. Origine et habitat . . .	14
I.5. Innocuité des bactéries lactiques . . .	15
I.6. Taxonomie et caractères distinctifs . . .	15
I.7. Domaines d'utilisation des bactéries lactiques . . .	16
II. Classification des bactéries lactiques . . .	17
II.1. Critères de la classification . . .	17
II.2. Les coques lactiques . . .	22
II.3. Les lactocoques . . .	23
II.4. Les lactobacilles . . .	26
III. Les ferments lactiques . . .	30
III.1. Les levains ou ferments lactiques dans l'industrie laitière . . .	30
III.2. Les interactions entre les souches bactériennes . . .	35
III.3. Rôles des bactéries lactiques et sécurité des aliments . . .	36
IV. Métabolisme des bactéries lactiques . . .	39
IV.1. Voies fermentaires des bactéries lactiques . . .	39
IV.2. Métabolisme des sucres chez les lactocoques . . .	43
IV.3. Métabolisme du citrate . . .	43
IV.4. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques . . .	45
V. Fermentation lactique en fromagerie . . .	46
V.1. La fermentation du lactose et la production d'acide lactique dans la fabrication des fromages . . .	46
V.2. Production d'arômes par les bactéries lactiques . . .	50
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES . . .	61
I. Matériel . . .	61
I.1. Source d'isolement . . .	61
I.2. Milieu de culture . . .	61
II. Méthodes . . .	62
II.1. Prélèvement du lait . . .	62
II.2. Échantillonnage . . .	62

II.3. Techniques d'isolement et de purification des souches lactiques . .	63
II.4. Identification des souches isolées . .	69
II.5. Méthodes physiques et chimiques . .	72
III. Composition et types de levains lactiques utilisés dans le caillé modèle . .	74
III.1. Types de levains . .	74
III.2. Composition des levains . .	74
III.3. Entretien des souches . .	75
III.4 Fabrication d'un caillé : Modèle expérimental . .	75
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS . .	78
I. Isolement, purification et caractérisation phénotypique et technologique . .	78
I.1. Choix des isolats . .	78
I.2. Identification . .	78
II. Etude des aptitudes technologiques des souches . .	84
II.1. Etude des aptitudes technologiques des souches en culture pure . .	84
II.2. Etude des aptitudes technologiques des souches en culture mixte . .	92
III. Influence du pH, taux d'ensemencement, température d'incubation sur la production du diacétyle du ferment (caillé) . .	106
III.1. Les facteurs influençant la production du diacétyle . .	106
III.2. Production de diacétyle au cours de l'incubation . .	107
IV. Etude de la qualité physico-chimique du lait caillé expérimental . .	109
IV.1. Mesure du pH ou acidité actuelle . .	109
VI.2. Acidité de titration en °D . .	109
Conclusion . .	110
REFERENCES . .	112
Annexes . .	130

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : Mes parents, les êtres les plus chers. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers eux. Mon mari et mes chers enfants. Toute la famille BENAZZOZ et GHOZLANE. Et à toutes les personnes que j'aime.

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, nous remercions Dieu Le Tout Puissant de nous avoir permis de réaliser ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance à Monsieur **BELLAL M'hand Mouloud**, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger, Directeur de ce mémoire pour son aide précieuse, je le remercie vivement pour ses conseils, sa disponibilité, sa contribution efficace et ses encouragements et surtout sa patience et son soutien qui ont grandement contribué à mener à terme ce mémoire.

Je remercie également :

Monsieur **YAKHLEF Hacem**, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Messieurs **MEKIMENE Lakhdar**, Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger et **NOUANI Abdelouahab** Maitre de Conférences à l'université de BOUMERDES qui ont accepté d'examiner ce travail.

En guise de reconnaissances, je remercie Madame **ANNOU BOUKHEMIA Saida** de l'université de BOUMERDES, **Said** de la DPGR, **Baya** la bibliothécaire, tout le personnel des départements de technologie alimentaire et zootechnie, ainsi que ceux de l'ITELV de Baba Ali.

Une tendre pensée à ma petite famille pour leurs encouragements, leur collaboration, leur soutien moral qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Résumé

25 souches de bactéries lactiques ont été isolées localement à partir du lait de vache (cru et caillé) et du leben, et caractérisées par la méthode classique, afin d'étudier leurs aptitudes technologiques acidifiantes et aromatiques :

5 lactobacilles, 3 Pediocoques, 3 Streptocoques, 2 Enterocoques, 8 lactocoques mésophiles (dont 6 souches acidifiantes appartenant aux espèces *Lactococcus lactis* ssp *lactis* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* et 2 souches aromatisantes appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*).

Le comportement de ces souches en culture mixte (binaire) a été étudié selon différents rapports d'ensemencement et les résultats ont été généralement bénéfiques.

Le ferment local préparé par les souches de Lactocoques mésophiles et Leuconostocs, choisies pour la fabrication du caillé modèle, ont donné des résultats appréciables comparativement à ceux de la littérature, dans la production du diacétyle (arôme caractéristique) du beurre et produits laitiers.

Mots clés : bactéries lactiques, diacétyle, acidification, arôme, *Lactococcus lactis* ssp.

Abstract

Twenty five strains of lactic acid bacteria were isolated from the milk of cow (raw and curdled) and from the Leben. They were characterized by the classical method to study their technological capacity to the acidification and aromatization.

Strains are composed of : 5 Lactobacilli, 3 Pediococcus, 3 Streptococci, 2 Enterococci, 8 mesophilic lactococci (including 6 acidifying strains belonging to the species *Lactococcus lactis* ssp *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* and 2 strains belonging to the species *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* flavouring).

The behavior of these strains in mixed culture (binary) has been studied and results were obtained generally satisfactory.

The local ferment prepared with mesophilic lactococci and leuconostocs, chosen for the preparation of pathway of curdled milk, gave a good result than those reported by the literature in production of diacetyl (specific aroma) of butter and dairy products.

Key words: Lactic bacteria, diacetyl, acidification, aroma, *Lactococcus lactis* ssp.

ص خلم

تم عزل 25 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك محليا من حليب البقر (الطازج واللبن الرائب) واللبن، وتتميز هذه الطريقة الكلاسيكية بدراسة خصائصها التكنولوجية الحمضية والحطرية :

5 عصيات لبنية (lactobacilles) , 3 Pedicoques , 3 عتديات (Streptocoques) , 2 عتديات (Enterocoques) , 8 lactocoques mésophiles (بما في ذلك 6 سلالات محمّصة تنتمي إلى الأنواع اللبينة الفسدية Lactococcus lactis ssp و Lactococcus lactis ssp cremoris وسلاطين معطرتين تنتمي إلى النوع Lactococcus lactis ssp diacetylactis).

سلوك هذه السلالات في الزراعة المختلطة (ثنائي) قد درس في نسب مختلفة ونتائج البذر كانت مفيدة بشكل عام. الخميرة المحلية المحضرة من السلالات Lactocoques mésophiles و Leuconostocs. أختبرت لصنع نموذج تخثر، وقد أعطى نتائج قيمة مقارنة مع تلك الموجودة في المراجع، في إنتاج ثنائي الأستيل (نكهة مميزة) من الزبدة ومنتجات الألبان.

كلمات البحث: بكتيريا حمض اللاكتيك، ثنائي الأستيل، تحض، نكهة، Lactococcus lactis ssp.

Liste des abréviations

- °C : Degré Celsius.
- μm : Micromètre.
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- **ALD** : α -acétolactate décarboxylase.
- **ALS** : α -acétolactate synthétase.
- **ARN** : Acide ribonucléique.
- **a_w** : Activité de l'eau.
- **CoA** : Coenzyme A.
- **Da** : Dalton.
- **DR** : Diacétyle réductase.
- **h** : Heures.
- **LDH** : Lactate déshydrogénase.
- **ml** : Millilitre.
- **Mmol** ; **Mmol/L** : Millimole , Millimole par litre
- **NAD** :Nicotinamide-adénine dinucléotide.
- **NADH** :Nicotinamide-adénine dinucléotide oxydase.
- **NADP** :Nicotinamide-adénine dinucléotide-phosphate.
- **nm** : Nanomètre.
- **p/v** : Poids par volume.
- **pH** : Potentiel hydrique.
- **ppm** : Partie par million.
- **R L/S** : Rapport Leuconostoc /lactocoque.
- **R. d'ens** : Rapport d'ensemencement.
- **UFC** : Unité de formation des colonies.
- **UHT** : Ultra Haute Température.

Introduction

Depuis plusieurs siècles, l'homme a mis à profit la fermentation pour conserver un grand nombre de ses aliments.

Au cours de la fermentation, il se produit des modifications de la texture et de la saveur du produit. Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'élaboration des produits alimentaires en particulier les produits laitiers fermentés par des procédés de fermentation lactique ; elles assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture, mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée par la production d'acides organiques (dont le principal composé majeur est l'acide lactique), qui font baisser le pH du milieu et, par la synthèse des bactériocines qui renforcent cette conservation.

Parmi les molécules aromatiques produites par ces bactéries on peut citer le diacétyl, responsable du goût typique de noisette dans le beurre, dans les crèmes et certains laits fermentés.

De ce fait, la synthèse du diacétyl et son accumulation par voie microbiologique ont fait l'objet de nombreuses études afin, de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de régulation mis en jeu.

L'industrie laitière a pris un essor considérable par la sélection de souches de bactéries lactiques. Cette sélection est basée sur la capacité de production d'acide lactique, de composés aromatiques.

L'intérêt manifesté par l'industrie laitière pour la conservation des cultures de levains, leur activité et leur pouvoir aromatisant n'a cessé de croître au cours des dernières années. Pour le consommateur, en effet, un des principaux critères de choix d'un produit laitier est, son arôme. Ceci a conduit les chercheurs à étudier les microorganismes producteurs et utilisateurs des divers composants de l'arôme de ces produits.

Les composants de l'arôme les plus abondants sont : le diacétyl, l'acétaldéhyde, l'éthanol et les acides organiques volatils. Il a été reconnu que les plus importants sont l'acide lactique et le diacétyl, le premier fournissant un goût agréable, le second étant à la base de l'arôme.

Les conclusions de la plupart des études concernant l'origine de la production de diacétyl indiquent que ce composé est formé à partir des citrates seuls ou de l'ensemble citrates- sucres fermentescibles (Lacrampe et Weber, 1973).

En effet, les souches utilisées pour la constitution des levains sont des souches mixtes, et qu'au sein des levains obtenus, les proportions respectives des souches pures peuvent varier et modifier par là-même, la texture et l'arôme du produit final. Il convient donc, en particulier de déterminer avec rigueur les températures d'incubation ainsi les taux d'ensemencement des levains à utiliser pour obtenir un produit de qualité constante.

Une température d'incubation de 21-22°C, est la température que Hammer et Babel (1943) suggèrent à l'emploi, pour maintenir un équilibre correct avec acidification et production d'arôme.

Beaucoup de rapports signalent que, la production maximum de diacétyl pour les espèces de *Leuconostocs* cultivées dans le lait est atteinte à un pH voisin de 4,3, et des articles dans la littérature mentionnent que la production de diacétyl est favorisée par une aération des levains, et, qu'il y aurait oxydation de l'acide α -acétolactique en diacétyl par l'oxygène atmosphérique à 21°C (Van Beynum et Pette, 1939).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées à l'arôme des produits laitiers et en particulier la production de diacétyl. Le but étant, la sélection de bactéries productrices d'arôme et l'étude de leur comportement en cultures mixtes associées à des microorganismes acidifiants.

Bien qu'il s'agisse de deux problèmes différents, la production d'acide lactique et celle d'arômes peuvent être abordés de la même façon, dans la mesure où il s'agit d'apprécier la formation d'un ou de plusieurs métabolites en fonction de la nature du milieu, des conditions d'environnement et de souches microbiennes impliquées.

Notre préoccupation a donc été de définir un modèle expérimental, de sélectionner des bactéries lactiques présentant un réel potentiel aromatique et d'apprécier la production d'arôme dans des conditions d'environnement déterminées.

Nous présenterons donc, le modèle du protocole de fabrication du lait caillé, les méthodes, les souches, les résultats et les conclusions.

- Objectifs de l'étude

Production de diacétyl responsable de l'arôme de produits laitiers à partir des bactéries sélectionnées (localement). Les différentes étapes de notre étude peuvent être résumées comme suit :

- Sélection des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyl), (après isolement et caractérisation).
- Etude du comportement des souches sélectionnées en cultures pures et mixtes.
- Pouvoir acidifiant et production de diacétyl.
- Constitution d'un ferment mixte aromatique pour la fabrication d'un caillé, et la quantification du constituant aromatique « diacétyl ».
- Optimisation de la production de diacétyl en fonction du temps et à des températures d'incubation différentes.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les bactéries lactiques : Généralités

I.1. Découverte des bactéries lactiques

Le terme bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873.

Historiquement, les premiers genres à être décrits sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ; les genres ci-après: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* sont considérés comme les principales bactéries lactiques du point de vue technologique (Guiraud et al, 2003 ; Limsowtin et al, 2004).

I.2. Caractéristiques générales

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen en 1919 et réunit plusieurs genres, caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique à partir de l'hydrolyse du lactose, et de la fermentation du glucose et/ou du galactose.

Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004). Quant aux bifidobactéries, celles-ci sont considérées comme des bactéries lactiques en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique tel que le tube gastro-intestinal (Klein et al, 1998).

Selon Luquet (1990), les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes, elles sont Gram positifs (+) de forme sphérique allongées ou en bâtonnets, immobiles, asporulées, anaérobies ou aérobies, mais aérotolérants, dépourvues de cytochromes-oxydase, de catalase et de nitrate-réductase. Cependant, certaines souches sont pseudo-catalases (présentent une réaction) peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique (Bourgeois et al, 1996 ; Larpent et al, 1997). En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux (Dellagio et al, 1994).

Depuis longtemps, nous savons que les composants des épices stimulent la production d'acide lactique par les cultures starters, Hagen et al (2000) ont prouvé que le manganèse est le seul composant des épices qui ait cette propriété. Le métabolisme des bactéries

lactiques dépend des quantités du Mn^{2+} présent dans le milieu de culture, et le besoin en Mn^{2+} diffère d'une espèce lactique à l'autre.

I.3. Description et utilisation

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (comme ferments lactiques, probiotiques, agents de conservation) (Streit, 2008).

Parmi ces applications, l'industrie laitière est sans doute le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (Hugenholtz et al, 2002).

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 et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale (Streit, 2008).

Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH. Les bactéries participent également à la texture (production d'exo polysaccharides) et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples, parfois indésirables (amines biogènes) et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présent dans le lait (lactose, citrate...), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses.

L'accroissement sans cesse de la production des produits laitiers fermentés et surtout de fromage : 18 millions de tonnes en 2004 alors que seulement 15 millions de tonnes étaient produites en 1999 (Raynaud, 2006) conduit aujourd'hui à une rationalisation indispensable de l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie.

La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité. Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, Il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arôme (Hols et al, 1999 ; Hugenholtz et al, 2000).

Les bactéries lactiques selon Streit (2008) sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que « probiotiques ». Ces bactéries probiotiques représentent les « microorganismes vivants qui, à travers leur ingestion à une certaine concentration, exercent un effet positif sur la santé humaine au-delà de la nutrition traditionnelle » (Guarner et Schaafsma, 1998).

I.4. Origine et habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait, qui, par sa composition riche en substances nutritionnelles et en facteurs

de croissance constitue un excellent milieu de culture pour les bactéries lactiques aptes à assimiler ses constituants par différentes voies microbiennes (Alais, 1984). Ces bactéries, peuvent coloniser, grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, d'autres milieux très différents, du point de vue physicochimique et biologique, riches en principaux nutriments indispensables à leur croissance.

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, on les rencontre dans les végétaux (ensilage, choucroute, fruits, graines) sur la peau, dans le tractus digestif humain et animal, muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes. Elles survivent dans un milieu à faible a_w et résistent à l'éthanol (10 – 15%) et au CO_2 (Ho, 2008). Elles ont été également trouvées dans les produits carnés frais et maturés, dans les poissons conservés et dans les produits laitiers (Romeo et al, 2001).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans la transformation des viandes et la production des boissons alcooliques et de légumes fermentés (Carr et al, 2002). Ces aliments incluent les saucisses, les jambons, les vins, les bières et les conserves de légumes acidifiés.

En technologie laitière, leur principale caractéristique est leur capacité à coaguler le lait, par production de quantité importante d'acide lactique.

I.5. Innocuité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont depuis des siècles associées à l'alimentation humaine et animale. Ces micro-organismes sont tolérés par l'homme et les animaux (Ström et al, 2005) ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer et al, 2005). Les bactéries lactiques peuvent donc être considérées comme des micro-organismes dépourvus de toute toxicité pour le consommateur et sont particulièrement appropriées pour être utilisées comme des agents de biopréservation.

Dans la littérature, aucune donnée n'existe à ce jour rapportant chez l'homme ou chez l'animal, des effets nocifs résultant de la consommation des aliments contenant des bactéries lactiques. Bien au contraire, ce sont surtout les effets bénéfiques de ces organismes qui sont largement rapportés (Salminen et al, 2004).

Ainsi, les souches lactiques sont donc des micro-organismes d'une très grande innocuité, bénéfiques pour l'alimentation humaine et animale. Ainsi, considérant la demande des consommateurs qui exigent de plus en plus des produits naturels sains dépourvus de toute nocivité.

I.6. Taxonomie et caractères distinctifs

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variants au sein d'une même espèce. Ces tests sont :

- Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire.
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles.

- La synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exo polysaccharides), de bactériocines.
- La résistance aux bactériophages.

I.6.1. Les caractères morphologiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. D'après les caractères morphologiques, on distingue deux grands groupes : les coques et les bacilles.

- **Les coques (cocci)** : en forme sphérique plus ou moins ovoïdes de 0,5 à 1,5 µm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, de tétrades, des chainettes ou des amas. Ce sont des bactéries non sporulées et immobiles (Medina, 2000 cité par Koïche, 2011).
- **Les bacilles** : sont de petits bâtonnets, plus ou moins allongés de 0,5 à 2 µm de diamètre et de 1,5 à 10 µm de long, se présentent en paires ou en chainettes de longueur variable (De Roissart, 1986).

I.6.2. Les caractères physiologiques et biochimiques

La différenciation taxonomique des bactéries lactiques s'est appuyée très tôt sur un ensemble de caractères physiologiques et biochimiques importants en application industrielle. Les différences phénotypiques observées entre les espèces et genres de ce groupe bactérien résultent vraisemblablement de modifications génétiques produites en cours de l'évolution (Deroissart et Luquet, 1994 cité par Abada et al, 1996).

Les premiers caractères utilisés pour différencier les bactéries lactiques sont basées sur :

- La quantité d'acide lactique produite au cours de leur culture dans le lait et dans d'autres milieux courants.
- Les températures de croissance minimales, optimales et maximales (thermophiles et mésophiles).
- La tolérance à l'oxygène et à différente concentration de chlorure de sodium.
- L'aptitude à produire du gaz et des composés aromatiques volatils.

De même, des caractères liés sans doute à l'habitation d'origine ont été utilisés pour la différenciation des bactéries lactiques, tels que : la production d'ammoniac à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires à différentes valeurs de pH.

L'aptitude à métaboliser les glucides comme source de carbone et d'énergie s'avère un caractère important pour la classification des bactéries lactiques.

D'autres tests d'identification peuvent être utiles : c'est le pouvoir hémolytique et la capacité amylolytique pour les streptocoques, la production du diacétyl, d'acétoïne et de dextrane pour les Leuconostocs et pour certains biotypes de Lactocoques, et enfin les exigences nutritionnelles notamment en vitamines pour les lactobacilles.

I.7. Domaines d'utilisation des bactéries lactiques

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire

- **Dans le domaine de l'agriculture**, les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. Ainsi, on a pu observer chez le bétail une augmentation de 5 à 11 % des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière (Salawu et al, 2001 ; Khuntia et Chaudhary, 2002). L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Weinberg et al, 2004 ; Gollop et al, 2005).

- **Dans le domaine de la santé**, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbrueckii, sub sp bulgaricus* (Salminen et al, 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie.

- **Enfin en industrie agro-alimentaire**, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales.

Eu égard à leur pouvoir acidifiant, leur capacité à améliorer la saveur et la texture des aliments, les bactéries lactiques sont de loin des agents d'amélioration de la qualité organoleptique des aliments (Bigret, 1989).

Dans les produits laitiers, ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait, la formation des composés aromatiques, la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

Pour optimiser les caractéristiques organoleptiques du lait, les bactéries lactiques sont souvent utilisées en association. C'est le cas de *Streptococcus thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, utilisées dans la fabrication du yoghourt. Dans les produits carnés, les bactéries lactiques améliorent la qualité hygiénique et marchande en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables. Les bactéries lactiques favorisent en outre, l'accélération du processus de maturation et assurent une meilleure conservation de ces produits.

II. Classification des bactéries lactiques

II.1. Critères de la classification

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen.

Les marqueurs chimiotaxonomiques tels que la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification (Krieg, 2001). Les nouvelles techniques pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment en causes et / ou complètent les approches phénotypiques anciennement utilisées.

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

- Lactobacillaceae regroupe les Lactobacillus, Paralactobacillus et Pediococcus.
- Leuconostocaceae comprend les Leuconostoc, Oenococcus et Weisella.
- Streptococcaceae contient les Streptococcus, Lactococcus et Lactovum.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques indiquent que ces micro-organismes peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel Bergey –Trust (Garrity et al, 2008).

La nouvelle classification (basée sur l'homologie des séquences de l'ARN ribosomique (16S) a été apportée par Bergey's manuel turst (2000) cité par Amrouche (2003). Les genres des bactéries lactiques appartiennent aux :

Phylum B XIII : Firmicutes.

Classe III : Bacilli.

Ordre II : Lactobacillales.

Famille I : Lactobacillaceae.

Genre I : Lactobacillus.

Genre II : Pediococcus.

Famille III : Camobacteriaceae.

Famille IV : Enterococaceae.

Genre I : Enterococaceae.

Genre I : Tetragenococcus.

Genre IV : Vagococcus.

Famille V : Leuconostocaceae.

Genre I : Leuconostoc.

Genre II : Oenococcus.

Famille VI : Streptococaceae.

Genre I : Streptococcus.

Genre II : Lactococcus.

La classification s'appuie sur des critères moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN 16 S ribosomiques et les études basées sur ces critères moléculaires ont permis de classer les espèces comme suit :

La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permet d'observer le type d'espèces selon la nature de la liaison peptidique.

La composition de l'ADN mesurée par hybridation permet de différencier les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage en bases Guanine + Cytosine (G – C) % permet le rapprochement des genres streptococcus (34 – 46%), Leuconostoc (36 – 43%) et pediococcus (34 – 42 %) (Schleifer, 1986 ; Farrow et al, 1989). Le pourcentage de (G – C%) des espèces du genre lactobacillus est très hétérogène et varie d'une espèce à une autre de 32 à 53%, comme le montre le tableau 1 (Scardovi, 1986). Cependant, les espèces des genres Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc ou Streptococcus, dont le G-C % de l'ADN est inférieur à 50 % peuvent être regroupées dans la branche des Clostridium avec Bacillus, et séparées de la branche des Actinomycétales au G-C % supérieur à 50 %, comprenant Propionobacterium et Bifidobacterium (Stackebrandt et al, 1983 ; Stackebrandt et Teuber, 1988).

Genres	Cellules		Fermentation	ADN G-C (%)	Références
	Forme	Arrangements			
<i>Streptococcus</i>	Coques	Chaines	Homolactiques	34 - 46	SCHLEIFER, 1986
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Chaines	Hétérolactiques	36 - 43	FARROW <i>et al.</i> , 1989
<i>Pediococcus</i>	Coques	Tétrade	Homolactiques	34 - 42	SCHLEIFER, 1986
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Chaines	Homolactiques et Hétérolactiques	32 – 53	KANDLER et WEISS, 1986a et b

Tableau 1. Les différents genres de bactéries lactiques

(Scardovi, 1986)

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles : certaines sont psychrotolérantes ou thermo-tolérantes. Elles se développent majoritairement à pH = 4,0 – 4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (tableau 2). Enfin les bactéries possèdent de faibles activités protéolytique et lipolytique et ont une exigence marquée en acides aminés, dérivés de bases puriques et pyrimidiques et vitamines B (Caplice et Fitzgeorald, 1999).

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leucomostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	+/-

B : bacilles ; C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

Tableau 2. Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques.

(Axelsson,2004)

Notes :

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; nd : non déterminé.

a) Weissella peuvent être également sous forme de bacille.

b) Type de fermentation du glucose: homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

c) Faible quantité de CO₂ produite selon le milieu

d) Peuvent ne pas se développer dans 8 % NaCl.

e) Production d'acide lactique **D, L, ou DL** acide variable selon les espèces

Les relations phylogéniques existant entre les différents genres de bactéries lactiques sont présentées par un arbre phylogénique dans la (figure 1).

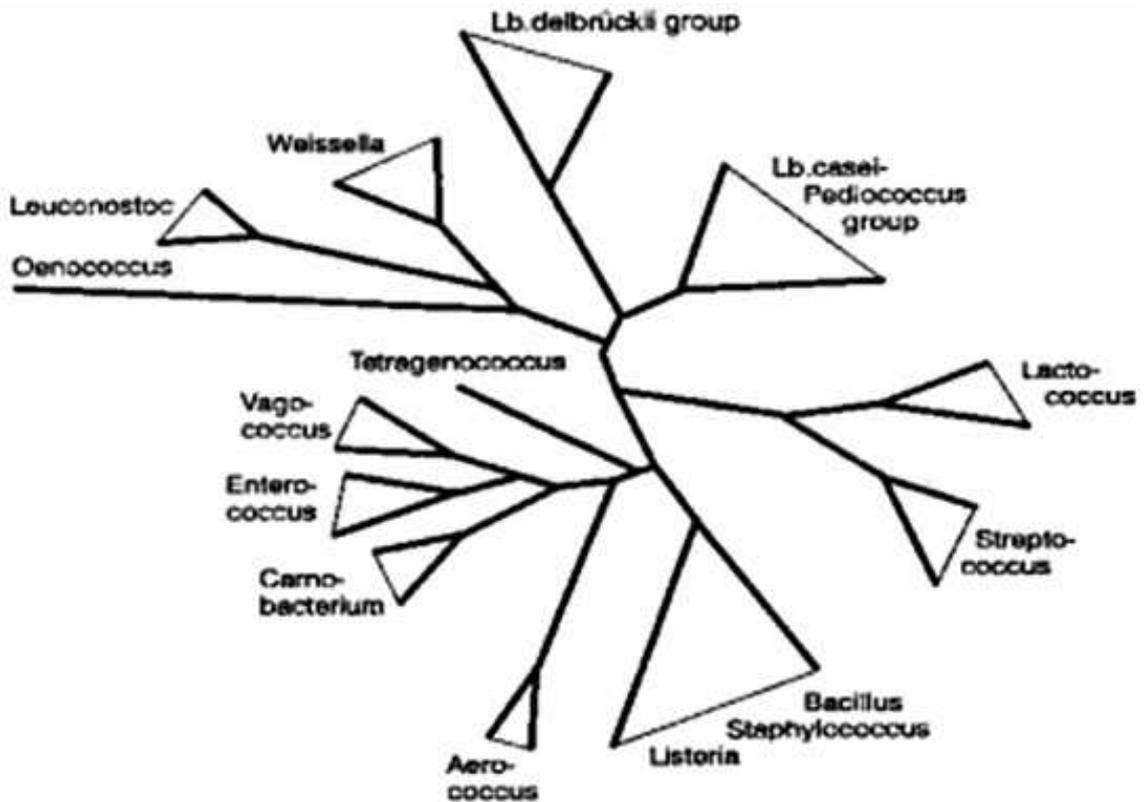


Figure 1 . Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (Axelsson, 1998)

Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences des ADN16S. La distance évolutive relative séparant deux genres est la somme des longueurs totales des branches (Balliarda, 2003)

Le *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes: *Enterococcus*, L'ancien genre *Lactococcus* et *Streptococcus* sensu stricto, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un genre séparé: les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires, les *Leuconostoc oenos*, les «*Leuconostoc* du vin», ont formé le genre *Oenococcus*. Des genres nouveaux, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Tous les genres principaux de bactéries lactiques décrits sont classés dans le même phylum, classe et ordre:

Phylum BXIII : Firmicutes.

Classe I : Bacilli.

Ordre II: Lactobacillales.

II.2. Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des Streptococcaceae. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. Ce sont des coques en paire ou en chaîne, Gram +, catalase (-), non sporulés, immobiles et anaérobies facultatives (Ho, 2008). La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétéro lactique).

Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella (Stiles et Holzappel, 1997).

Les genres Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus : Ils étaient anciennement groupés en un seul genre Streptococcus. Ils sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C. Parmi le genre Streptococcus, le groupe viridans comprend les agents d'acidification fréquents dans certains fromages et yaourts comme le cas de l'espèce *Sc. thermophilus*. (Skinner et Quesnel, 1978).

Plusieurs études sur la microflore des fromages traditionnels des pays méditerranéens ont montré que les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages, probablement au travers de la protéolyse et de la lipolyse d'où leur contribution à la saveur des produits. Ces bactéries sont également trouvées dans les autres produits fermentés tels que les saucisses et les olives (Franz et al, 2003).

Leuconostocs : Ils représentent les coques hétéro-fermentaires, produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol ; et se regroupent en paires ou en chaînes, et sont catalase (-). La classification des espèces basée sur le C-G% a permis de distinguer trois espèces : *Ln. mesenteroides* (et ses trois sous espèces : *subsp. Mesenteroides* ; *subsp. dextranicum* et *subsp. Cremoris*), *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. enos* (Yang et Woese, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993).

La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux (tableau 2). 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 hétéro-fermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Ainsi, ils se différencient des autres coques par la fermentation hétéro lactique et des lactobacilles hétéro-fermentaires par leur morphologie. Les tests 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 *Ln. mesenteroides* ssp. *Cremoris*, sont utilisés pour produire des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait.

- **Pediococcus** : Ils rassemblent des coques homo-fermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique). Mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (Guiraud, 1998).

II.3. Les lactocoques

II.3.1. Caractéristiques

Appartiennent à la Famille des Streptococcaceae, Genre *Lactococcus*, ils sont étroitement associés aux produits laitiers, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière (Teuber et al, 1995). C'est la souche importante qui intéresse notre étude, et que nous développerons en détail.

Le genre *Lactococcus* correspond au groupe des streptocoques lactiques. Il est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Ces espèces sont dépourvues de catalase, incapables d'utiliser l'oxygène, mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes), elles prédominent en fermentation laitière et constituent le groupe des levains mésophiles. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait à travers leur métabolisme homofermentaire et former des arômes. Leur température optimale de croissance s'étend de 25° à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C.

Les habitats les plus importants des lactocoques sont le lait, les laits fermentés et les fromages, où ils sont en quantité dominante et dans lesquels ils jouent un rôle irremplaçable en assurant le développement de la structure et du goût. Ils peuvent également être utilisés dans la conservation de charcuteries, de fruits, de légumes et de céréales (Dellaglio et al, 1994).

Actuellement, ce genre comporte plusieurs espèces et sous-espèces dont les plus importantes en industrie laitière sont (Guiraud, 1998):

- *Lc. Lactis* subsp. *lactis*.
- *Lc. Lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- *Lc. Lactis* subsp. *Cremoris*.

Les sous espèces et biovariant se différencient selon certains caractères métaboliques, comme l'utilisation du citrate et de l'arginine. Seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (*L diacetylactis*) possède le plasmide induisant la transformation du citrate en diacétyle. cette souche est considéré comme une souche aromatisante, et le diacétyle étant la molécule responsable de l'arôme de beurre, et le constituant recherché dans notre étude.

Les distinctions entre les espèces et les sous-espèces de *Lactococcus* sont données par le tableau 3.

	Mobilité	VP	Croissance à				Croissance dans NaCl		
			10°C	40°C	45°C	pH 9,6	2%	4%	6,5%
<i>Lc.Lactis subsp .lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>Lc. Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	-	v	+	+	-	-	+	+	-

	Résistance 30mn/63°C	Bile	P° de gaz	Esc	Arg	LS	LT	Cit	gélatinase
<i>Lc.Lactis subsp .lactis</i>	v	+	-	+	-	v	arc	-	-
<i>Lc. Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	v	+	-/+	v	+	+	arc	+	-
<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i>	v	-	-	v	+	+	arc	+	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	v	-	-	v	+	v	/	-	-

	Profils fermentaires							
	Lactose	Maltose	Mannitol	Melibiose	Gala	Sac	Ara	ribose
<i>Lc.Lactis subsp .lactis</i>	+	+	-	-	+	v	-	+
<i>Lc. Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	+	-	-	-	+	v	-	-
<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	+	v	+	-	+	-	v	+

Tableau 3. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques (Guiraud, 1998)

Symboles :

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; v : variable ; a : acidification ; r : réduction ; c : coagulation. VP : acétoïne ; LT : lait tournesolé ; LS : lait de Sherman ; Esc : esculine ; Cit : citrate ; Arg : arginine P° : production. Gala : galactose ; Sac : saccharose ; Ara : arabinose.

II.3.2. Besoins nutritionnels des lactocoques

Les lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique comme toutes les bactéries lactiques, ce qui explique leurs exigences du point de vue nutritionnel (tableau 4) ; Ils utilisent pour leur croissance des éléments complexes carbonés, azotés et phosphatés, ainsi que des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (Konings et al, 1994).

Substances de croissance	<i>Lc.Lactis subsp.lactis</i>	<i>Lc. Lactis subsp.cremoris</i>	<i>Lc. Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>
Acides aminés			
Lysine	-	-	-
Leucine	+	+	+
Histidine	+	+	+
Valine	+	+	+
Cystéine	S	+	S
Aspartate	nd	nd	nd
Glutamate	+	+	+
Isoleucine	+	+	+
Tyrosine	nd	nd	nd
Méthionine	+	+	+
Vitamines			
Vit. B12	+	+	+
Biotine	+	+	+
Niacine	+	+	+
Pantothécate	+	+	+
Riboflavine	+	+	+
Thiamine	+	+	+
Pyridaxol	+	+	+
Acide folique	+	+	+
Acides organiques			
Acide acétique	+	+	+
Acide oléique	+	+	+
Acide orotique	nd	nd	nd
Acide formique	nd	nd	nd
Acides nucléiques			
Hypoxanthines	S	-	-
Adénine	S	S	-
Guanine	S	-	-
Thymine	S	-	-
Thymidine	S	-	-
Uracil	S	-	-

Tableau 4. Besoins nutritionnels des lactocoques

(Konnings et al, 1994)

Symboles :

+ : Essentiel à la croissance, - : Non requise pour la croissance, **S** : Stimulant, **nd** : non déterminé.

II.3.3. Rôles des lactocoques

Les lactocoques ont une grande importance dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière. Ils sont classés, selon (Novel, 1993) en Souches acidifiantes : *Lc.Lactis subsp lactis* et *cremoris*.et en Souches aromatisantes : *Lc. Lactis subsp.lactis*biovar *diacetylactis*.

Ces souches sont utilisées, comme ferments mésophiles, en particulier pour la fabrication de différents fromages, comme : les fromages frais : Quarg, Féta, Cottage cheese ; les fromages à pâte molle : Camembert, Brie, Pont Evêque, Coulommiers ; les

fromages à pâtes pressées : Cheddar, Gouda, Edam ou des fromages à pâte persillée : Roquefort, Gorgonzola et autres bleus (Fox et al, 1993 ; Loones, 1994). Elles sont utilisées encore pour la préparation du kéfir, du beurre et de certains laits fermentés tel que le vili finlandais (Hermier et al, 1992). Parmi leurs rôles utiles nous pouvons citer :

- Production d'acide lactique

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Schmidt et al, 1994).

En pratique, il convient de prendre en considération deux aspects de la production d'acide lactique : la vitesse d'acidification (dépend de la composition du milieu et de la température d'incubation) et le niveau maximal de production. Avec les lactocoques, l'acidité maximale correspond à un pH de 4,5 (Antoine et al, 1993).

- Production d'arômes

Aktypis et al (1998) admettent que parmi les différents produits de la fermentation lactique, l'acétaldéhyde et le diacétyl jouent un rôle prédominant sur la saveur et l'arôme des produits laitiers. *Lc. Lactis subsp.lactis bivas diacetylactis* est à cet égard particulièrement intéressante car elle est apte à produire des quantités importantes de diacétyl et d'acétaldéhyde à partir des citrates (tableau 5).

Souches	Diacétyl (µg/ml)	Acétaldéhyde (µg/ml)
<i>Lc. Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>	0,60 – 55,0	2,2 – 11,3
<i>Lc.Lactis subsp .lactis</i>	0,05 – 0,10	0,7 – 2,3
<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i>	0,05 – 2,3	0,3 – 3,7

Tableau 5. Production de diacétyl et d'acétaldéhyde par les lactocoques

(Schmidt et al, 1994)

II.4. Les lactobacilles

II.4.1 Définition et caractéristiques

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries (très utilisées en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de choucroute...) (Joffin, 2000).

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles longs et fins souvent regroupés en chaînes (parfois incurvés), ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries.

Les cellules sont généralement immobiles, anaérobies. La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Axelsson, 1993).

es lactobacilles mésophiles sont des bactéries classiques du lait et produits laitiers. On les rencontre aussi dans les végétaux, la flore intestinale et la flore vaginale, etc. (Saxelin et al, 1998).

Orla-Jensen (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium* (tableau 6).

Groupe I : Thermobacterium

Ce groupe rassemble les lactobacilles homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses par la voie d'Emden MeyerHoff Parnas(EMP). Ces bactéries se développent à 45°C. Plusieurs espèces sont trouvées dans le lait comme *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*...etc. Les bactéries de ce groupe sont caractérisées par l'importante quantité d'acide lactique produite par ces germes. Chaque espèce possède des aptitudes très limitées à fermenter divers sucres.

Groupe II : Betabacterium

Les espèces de ce groupe ont un métabolisme strictement hétéro fermentaires, qui fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂. (Voie hétéro fermentaires de la 6- phosphogluconate déshydrogénase / phosphocétalase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (Voie hétéro fermentaires de la glycéraldéhyde -3- phosphate / pyruvate Kinase / lactose déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

Groupe III : Streptobacterium

Ce groupe représente les bacilles hétéro-fermentaires facultatifs. Ils métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homo-fermentaire d'Emden-Meyerhoff-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétéro-fermentaires en acides lactique et acétique. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (Stiles et Holzapfel, 1997).

L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques très différentes) (Schleifer et Ludwig, 1995).

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie, fromagerie, charcuterie, dans la fabrication de la choucroute, Dans les yaourts, les *Lb. bulgaricus* forment des peptides utilisés ensuite par les *Streptococcus thermophilus*.

L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de la thréonine par l'aldolase de *Lb. bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, ...) interviennent pendant l'affinage des fromages. Les *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. bulgaricus* agissent avec les *Streptococcus thermophilus* dans les fromages à pâte cuite. A propos du kéfir, *Lactobacillus kefir*, *Lb. kefirianofaciens* et les autres lactobacilles mésophiles ont démontrés leur contribution à la fabrication du produit. Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisin, choucroute, cornichon...) (Rodas et al, 2005 ; Figueiredo et al, 2008).

Selon Atlan (2000), ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par Orla-Jensen (1919).

- Le groupe *delbrueckii*.
- Le groupe *casei-Pediococcus*.

Le groupe *Leuconostoc*.

La taxonomie moléculaire a différencié *Leuconostoc oenos* en un nouveau genre bactérien : *Oenococcus oeni*.

Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991 ; Gordin et Gorbach, 1992).

D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, tels que *Lb. Bulgaricus* et *St. thermophilus*.

Leur classification dans les probiotiques ainsi que parmi les microorganismes GRAS (Generally Regarded As Safe) fait de ces bactéries des acteurs potentiellement importants dans les domaines de la médecine et de la santé : amélioration de la digestion du lactose, stimulation du système immunitaire, vecteurs de molécules à effets thérapeutiques.

Groupe 1 : <i>Thermobacterium</i> (Homofementaires stricts)	Groupe 2 : <i>Streptobacterium</i> (Homofementaires facultatifs)	Groupe 3 : <i>Bêtabacterium</i> (Hétérofermentaires stricts)
Groupe <i>delbrekii</i>	Groupe <i>plantarum</i>	Groupe <i>fermentum</i>
G-C: 49-51 %	<i>Lb. Plantarum</i>	<i>Lb. san francisco</i>
<i>Lb. delbrekii</i>	<i>Lb. pentoseus</i>	<i>Lb. Brevis</i>
<i>Lb. ssp. delbrekii</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. ssp. lactis</i>	Groupe <i>casei</i>	<i>Lb. Kefir</i>
<i>Lb. ssp. bulgaricus</i>	<i>Lb. casei ssp. casei</i>	<i>Lb. Fructivorans</i>
<i>Lb. ssp. Leichmani</i>	<i>Lb. casei ssp. alactosus</i>	
	<i>Lb. casei ssp. Pseudopantarum</i>	
G-C: 33-41 %	<i>Lb. casei ssp. rhamnosus</i>	
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. Johnsoni</i>	
<i>Lb. helveticus</i>		
<i>Lb. amylovorus</i>		
<i>Lb. crispatus</i>		
<i>Lb. gallinarum</i>		
<i>Lb. jensenii</i>		
<i>Lb. kefirifaciens</i>		
<i>Lb. Kefirgramum</i>		

Tableau 6. Classification des lactobacilles selon Orla-Jensen (1919) cité par Bekhouche (2006)

II.4.3. Biochimie des lactobacilles mésophiles

II.4.3.1. Métabolisme des sucres

Selon Novel (1993) les sucres utilisés par *Lactobacillus* comme toutes les bactéries lactiques sont fermentés essentiellement en acide lactique.

Lorsque la fermentation est homolactique, la production de lactate passe par la voie d'emben-Meyerhof-Parnos (EMP).

Lorsque la fermentation est hétérolactique, la voie employée est celle du pentose phosphate et aboutit à la production de lactate, d'éthanol et éventuellement d'acétate.

II.4.3.2. Métabolisme des protéines

Les protéases des lactobacilles mésophiles, en particulier de *Lb. casei* et *Lb. plantarum* sont liées à la paroi, elles assurent la dégradation préférentielle de la caséine β , mais toutes les caséines sont touchées (Guiraud, 1998).

II.4.3.3. Lipolyse et estérolyse

Les activités lipasiques et estérasiques ont été démontrées chez certain *Lactobacillus* homofermentaires mésophiles comme *Lb. casei* et *Lb. plantarum*.

Les triglycérides contenant des acides gras à chaîne courte sont les plus facilement hydrolysés (Desmazeaud, 1996).

II.4.3.4. Métabolisme des citrates

Le citrate seul ne peut être utilisé comme substrat de croissance par les bactéries lactiques, par contre en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote, *Lb. plantarum* et *Lb. casei* utilisent le citrate du lait (Collins et Gibson, 1999).

II.4.4. Rôles des lactobacilles mésophiles

II.4.4.1. Rôles technologiques

Les lactobacilles mésophiles jouent un rôle fondamental dans plusieurs productions agroalimentaires :

- Fabrication de fromages et des laits fermentés
 - *Lb. casei* est le ferment du yukult japonais (type de laits fermentés).
 - Des fromages de type Italien (Parmesan, Romano, Grana) contiennent *Lb. casei* *Lb. acidophilus* et *Lb. plantarum* associées à d'autres ferments (Joffin, 2000).
- Fabrication de produits carnés
 - La flore prédominante de la fermentation des produits carnés est constituée de *Lactobacillus*.
 - *Lb. plantarum* permet d'acidifier la charcuterie et d'empêcher un développement des microorganismes non désirés (Montel et Beuvier, 2003).
- Fermentation des végétaux

- Les lactobacilles utilisés pour la fermentation des produits végétaux : concombre, choux, olives, etc. sont : *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. fermentum* (Ferreira et Delf, 1999).

· L'industrie de la panification

- Une culture de *Lb. plantarum* et de *Candida tropicalis* à été mis au point en France pour la fabrication de pain au levain.

- Un ferment mixte composé de culture séparée de *Lb. plantarum*, *Lb. delbruekii* et *Lb. leichmanii* est aussi commercialisé pour la fabrication des "soda crackers".

- D'autres espèces de Lactobacillus peuvent être isolés des fermentations de panification, *Lb. brevis*, *Lb. casei* associées à d'autres souches bactériennes pourraient servir à la fabrication du ferment industriel (Antoine et al, 1993).

II.4.4.2. Rôles diététique et thérapeutique

Eli Metchnikoff fut, le premier à avoir suggéré d'utiliser les laits fermentés contenant une souche de lactobacille, capable de vivre dans le tractus intestinal, comme composant d'une alimentation utile à la santé humaine (Desmazeaud, 1996).

De nombreux auteurs (Sekin et al, 1994 ; Dilmi-Bouras, 2002) se sont intéressés, à l'étude de l'influence d'une alimentation à base de produits riches en cultures de microorganismes sur l'écologie du tube digestif et, d'autre part, à l'influence sur la santé humaine d'une alimentation avec des produits laitiers contenant des cultures de microorganismes.

II.4.5. Bactéries lactiques et sécurité des aliments

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfel, 1997). Elles sont principalement utilisées dans les produits fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation des aliments. Le rôle de choix qu'occupent les bactéries lactiques dans la fermentation et dans la biopréservation des aliments est la conséquence directe de leur capacité à produire au cours de leur croissance de l'acide lactique, qui réduit le pH de l'aliment et inhibe directement le développement de plusieurs micro-organismes (Brul et Coote, 1999). En plus de l'acide lactique, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites à action bactériostatique ou bactéricide. Outre, le rôle que peuvent jouer les bactéries lactiques dans les produits fermentés, ces micro-organismes peuvent être utilisés dans les produits non fermentés comme des cultures protectrices c'est-à-dire des cultures antagonistes qui sont ajoutées à un produit alimentaire dans l'intention d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes et/ou d'altération.

III. Les ferments lactiques

III.1. Les levains ou ferments lactiques dans l'industrie laitière

III.1.1. Production de ferments lactiques

Les bactéries lactiques, utilisées comme ferments, contribuent au développement de la texture, de la flaveur et de l'arôme des produits laitiers fermentés par la production de composés aromatiques comme le diacétyl (Prioult, 2007).

Selon le même auteur, la production de ferments concentrés vise à obtenir des ferments ayant une activité élevée, une grande quantité de cellules viables et un équilibre entre les souches dans les ferments mixtes. Différentes méthodes sont utilisées pour produire des ferments concentrés dont les cultures discontinues ou continues (en cellules libres ou immobilisées). La culture discontinue est la plus couramment utilisée en industrie, mais une inhibition de croissance des bactéries est observée par l'acide lactique produit au cours de la fermentation. La culture continue en cellules libres, très peu utilisée en industrie pour des raisons technologiques, élimine ce problème par un renouvellement constant du milieu de fermentation.

La technologie de l'immobilisation cellulaire (TCI) est utilisée actuellement en industrie pour la fermentation de la bière et la fabrication du pain. Cette technologie a été proposée pour la production de ferments mixtes en continu car, elle permet d'une part, d'éviter les différents problèmes précédemment cités pour les cultures discontinues et continues en cellules libres et, d'autre part, de produire efficacement et de façon stable un ferment mixte grâce au relargage des cellules en croissance dans les micro-colonies proches de la surface des billes.

III.1.2. Application industrielle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques furent et sont encore utilisées sous la forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie de transformation, en particulier de l'industrie laitière, conduit à la production de ferments industriels capables d'assurer à la fois la qualité et la constance du produit (Pfeiler et Klaenhammer, 2007). Ces ferments sont typiquement composés de bactéries lactiques acidifiantes auxquelles peuvent être associées des souches présentant des caractéristiques aromatiques (Gagnon, 2006).

Les bactéries lactiques produites comme ferments commerciaux sont des cultures pures ou un mélange appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium*. (Leveau et Bouix, 1993).

III.1.2.1. Les ferments lactiques traditionnels

Définition

Les bactéries lactiques ont longtemps été utilisées pour la conservation des aliments grâce à la production d'acide lactique au cours de fermentations. Les aliments fermentés les plus connus sont les laits fermentés, les fromages, les saucisses et le pain. Initialement, ces produits ont été fabriqués accidentellement mais l'effet protecteur et l'acidification a été rapidement reconnu (Gilliland, 1985).

Actuellement les produits laitiers fermentés sont les aliments fermentés les plus consommés et les plus diversifiés. Jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, la qualité des produits fermentés était variable en raison des contaminations importantes par d'autres bactéries lactiques non désirées. La sélection des bactéries et la conservation des souches sélectionnées pour la fabrication de produits aux qualités semblables et constantes au cours du temps est une préoccupation importante.

Les ferments sont ajoutés aux ingrédients de base et les bactéries se multiplient dans des conditions définies et contrôlées. Au cours de la fermentation, les bactéries produisent

des composés qui confèrent au produit fini ses propriétés caractéristiques comme l'acidité, la saveur, l'arôme et la texture (Dolyres, 2003). La baisse de pH observée quand les bactéries lactiques métabolisent le lactose en acide lactique a un effet conservateur sur le produit et améliore en même temps la digestibilité et les qualités nutritionnelles des produits fermentés (Gilliland, 1985).

Parmi ces cultures, on distingue :

- **Les ferments lactiques naturels** : provenant du lait n'ayant subi aucun traitement thermique et sont de composition complexe et variable selon le terroir d'où ils proviennent.
- **Les ferments lactiques sélectionnés** : qui sont composés d'une souche pure ou d'un ensemble de souches pures. On entend par souche pure, suivant la définition classique, une population formée à partir d'une colonie isolée sur boîte de pétri sur un milieu de culture gélosée, c'est-à-dire d'une culture provenant en principe d'une seule cellule bactérienne (Ouadghiri, 2009).

Les bactéries constituant ces ferments sont normalement, des espèces déterminées et leur activité globale caractérise le ferment : l'acidification, la protéolyse, la formation d'arôme. Actuellement, les souches commercialisées ont été isolées du lait ou des produits laitiers et en particulier des levains artisanaux (Wouters et al, 2002).

Les qualités exigées des ferments lactiques sont multiples. Ces derniers doivent être capables de transformer l'aliment en un nouveau produit possédant des propriétés définies et constantes et permettre une bonne conservation de l'aliment en le protégeant en particulier contre la détérioration par d'autres micro-organismes par le biais de l'acidification et de bactériocines, et par la production d'antibiotiques (Patrignani et al, 2006).

III.1.2.2. Les ferments mésophiles traditionnels

Les ferments traditionnels pour la fabrication de fromage comme le cheddar, le gouda, le bleu et le camembert sont généralement constitués de bactéries lactiques mésophiles ayant une température optimale de croissance aux environs de 30°C. Les lactocoques et les leuconostocs sont les espèces de bactéries lactiques retrouvées dans ces ferments (Prioult, 1999).

Certains ferments contiennent un mélange indéterminé de ces deux espèces mais dans tous les cas les souches acidifiantes de *L. lactis* et *L. cremoris* sont présentes. On distingue 4 groupes de ferments, suivant la présence ou non et la nature des bactéries aromatisantes : Les souches de *L. diacétylactis* et de *Leuconostoc* sont reconnues pour être des souches aromatisantes grâce à la synthèse de diacétyle responsable de l'arôme de beurre. Ainsi, les :

- Levains de type O ne contiennent pas de souches aromatisantes, alors que,
- Levains du type D et L contiennent respectivement des souches de *L. diacétylactis* et de *Leuconostoc*.
- Cultures DL contiennent un mélange de souches de *L. diacétylactis* et de *Leuconostoc* en plus de *L. cremoris* et *L. lactis* dans la plupart des cas.

Certains ferments sont composés de cultures pures de *L. crémoris* et *L. lactis* utilisées seules ou en mélange (Champagne, 1998).

III.1.3. Critères de sélection des souches

La sélection des bactéries et la conservation des souches sélectionnées pour la fabrication de produits aux qualités semblables et constantes au cours du temps est une préoccupation importante.

L'élaboration et formulation de ferments mixtes nécessitent la caractérisation approfondie des souches pures selon les critères technologiques de production et d'utilisation définis par l'industrie utilisatrice.

Le schéma de la figure 2 expose les différentes étapes de caractérisation des souches qui peuvent être utilisées pour la production de ferments mixtes aromatiques. Les caractéristiques reliées à la production de composés aromatiques seront discutées dans la section V.2 (L'arôme des fromages et l'activité bactérienne).

L'aptitude à la croissance dans le milieu et l'acceptabilité organoleptique sont des critères primordiaux lors de la sélection des souches, la croissance des souches dans le milieu étant essentielle au développement des caractéristiques technologiques et organoleptiques visées.

Le taux de croissance et une concentration cellulaire élevée sont les principaux critères d'aptitude à la production industrielle de ferments concentrés utilisés lors de la caractérisation des souches. La connaissance de la sensibilité phagique des souches est un critère de sélection très important lors de la constitution de mélanges bactériens. La croissance des bactéries lactiques est liée à la production d'acide lactique.

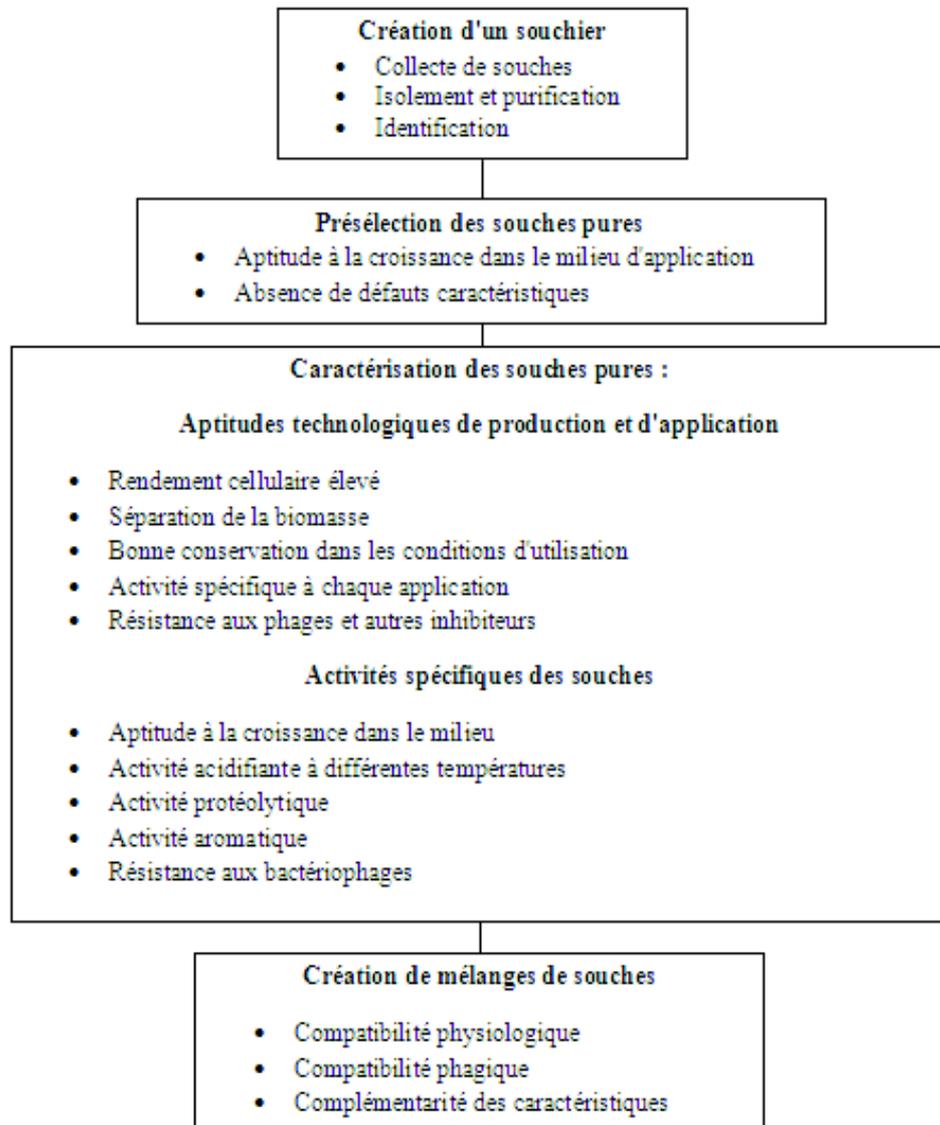


Figure 2. Principales étapes de la sélection des souches pour la formulation d'un ferment mixte aromatique

(Chamba et al, 1994 cité par Gagnon, 2006)

De nos jours, les bactéries lactiques sont, de plus en plus, recherchées pour d'autres qualités :

• **Nutritionnelles et thérapeutiques**, dans des préparations appelées probiotiques (Patrignani et al, 2006). Les bactéries probiotiques ont des effets bénéfiques pour la santé, allant au-delà des seules vertus nutritives (Schaafsma, 1996). Les plus connues des probiotiques et les plus utilisées sont des lactobacilles et des bifidobactéries.

Les aliments incorporant ces bactéries entrent dans la catégorie des "aliments fonctionnels". Ceux-ci regroupent tous les aliments proclamant des vertus positifs sur la santé. Leurs effets potentiels sur la santé et le bien être des humains sont nombreux (Stanton et al, 1998).

· **Production de bactériocines** : substances actives inhibant la croissance d'autres microorganismes qui sont généralement pathogènes (Touré et al, 2003).

III.2. Les interactions entre les souches bactériennes

Dans la pratique industrielle, les levains de bactéries lactiques ne sont jamais constitués d'une souche pure, mais de mélanges de souches. Dans ces conditions, des interactions métaboliques se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : la stimulation et l'antagonisme (Djidel, 2007).

III.2.1. Les phénomènes de stimulation

Les interactions entre deux populations microbiennes constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes. Boquien et al (1988) ont montré qu'en culture associée, le taux de croissance maximum de *Leuconostocs lactis* était augmenté en présence de *Lactococcus lactis subsp. crémoris*. Bellengier et al (1997) montrent au contraire, que le taux de croissance d'une souche de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, en présence d'une souche de *Lactococcus Lactis subsp. Lactis*, est inférieur à celui obtenu en culture pure. Leurs propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment lactique et acétique.

Enfin, l'exemple classique de protocoopération est l'interaction entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles qui, sont particulièrement mise à profit pour la fabrication des yaourts. Le rôle stimulant des Lactobacilles est obtenu par leur capacité d'hydrolyse des caséines par leur protéase de paroi, ce qui fournit des peptides aux streptocoques thermophiles généralement dépourvus de ce type d'enzymes (Shahbal et al, 1991). En retour, les lactobacilles sont stimulés par l'acide formique et le CO₂ produits par les streptocoques (Julliard et al, 1988). Certains variants de Lactocoques (prt⁻) présentent une déficience dans leur système protéolytique (perte de plasmide codant pour la protéase de paroi (Law et Haandrikman, 1997) et le système de transport opp (Yoo et al, 1996). Ainsi la perte du plasmide rend les bactéries dites (Prt⁻) par protéolytique, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait. D'autre part la souche (Prt⁺) est stimulée lorsqu'elle est cultivée avec sa souche parentale.

III.2.2. Les phénomènes d'antagonisme des bactéries lactiques

Qui dit association de culture dit possibilités d'interactions. Si elles sont bénéfiques pour l'une des souches ou les deux, on parlera de coopération entre les cultures. Si elles sont néfastes pour l'une des souches ou les deux, on parlera d'inhibition (Julliard et al, 1987) le terme de coopération regroupe les notions de commensalisme (interaction ayant un effet positif sur une des deux souches), de mutualisme et de protocoopération (interaction ayant un effet positif sur les deux souches).

La coopération et l'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière mettent en jeu des mécanismes de diverses natures. Il s'ensuit deux conséquences :

- S'il s'agit d'une coopération, l'acidification sera plus rapide ; il en sera de même de l'obtention des propriétés rhéologiques recherchées. Inversement, s'il y a inhibition, on observera un retard d'acidification.

- La seconde conséquence est qu'un levain complexe utilisé en industrie n'aura sûrement pas la même composition lorsqu'il est cultivé pour la première fois et après un certain nombre de repiquages.

Cela signifie que l'emploi des levains complexes en industrie laitière, bien qu'il présente des avantages (résistance aux phages, caractéristiques aromatiques de certains fromages), n'est pas sans contraintes. En effet beaucoup reste à faire dans l'étude de ces phénomènes de coopération et d'inhibition.

Dans les niches écologiques différentes, les micro-organismes entrent en compétition entre eux pour poursuivre et évoluer en flore unique. Dans certains écosystèmes alimentaires, les bactéries lactiques constituent la flore dominante. Ces organismes sont capables de produire des composés antimicrobiens contre la flore compétitive, y compris les bactéries pathogènes et d'altération (Davidson et Hoover, 1993).

Les effets inhibiteurs pouvant se produire dans un environnement donné, dépendent de la nature des ferments inhibiteurs, la nature des souches de contamination à inhiber, des proportions relatives des bactéries en présence et des conditions de culture. Le phénomène d'inhibition peut être relié à un ou plusieurs mécanismes : compétition nutritionnelle, changements physicochimiques du milieu (pH, formation d'agents réducteurs) et formation de produits antimicrobiens (Bourgeois et Larpent, 1996).

L'antagonisme des bactéries lactiques est attribué à l'abaissement de pH, aux acides non dissociés et à la production d'autres métaboliques antimicrobiens primaires et secondaires (Aslim et al, 2005).

L'effet antimicrobien primaire est exercé par les bactéries lactiques suite à la production d'acide lactique et la réduction du pH (Daeschel, 1989). Par ailleurs, ces bactéries sont capables de produire une grande variété de composés antimicrobiens comme : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Parmi ces dernières les mieux connues, la nisine, la seule bactériocine produite par les bactéries lactiques, purifiée qui ait été approuvée pour son utilisation dans les produits alimentaires (Hansen, 1994). La reuterine, composé antimicrobien de poids moléculaire faible, qui a été identifiée chimiquement (Talarico et Dobrogosz, 1989), et la souche productrice *Lactobacillus reuteri*, qui a été appliqué en tant que probiotique dans les produits laitiers (Rothschild, 1995).

III.3. Rôles des bactéries lactiques et sécurité des aliments

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzappel, 1997). Elles sont principalement utilisées dans les produits fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation des aliments.

Le rôle de choix qu'occupent les bactéries lactiques dans la fermentation et dans la bio-préservation des aliments est, la conséquence directe de leur capacité à produire au cours de la croissance, de l'acide lactique qui réduit le pH de l'aliment et, inhibe directement le développement de plusieurs micro-organismes (Brul et Coote, 1999).

Ces micro-organismes peuvent être utilisés dans les produits non fermentés comme des cultures protectrices, c'est-à-dire des cultures antagonistes, dans l'intention d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes et de prolonger la durée de conservation de l'aliment tout en réduisant le moins possible les propriétés organoleptiques de celui-ci (Vermeiren et al, 2004).

D'autres métabolites à action bactériostatique ou bactéricide sont également produits par les bactéries lactiques. Ces métabolites regroupent : l'acide acétique, le dioxyde de carbone, composés aromatiques (le diacétyl), la reutérine, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Baliarda, 2003).

III.3.1. Acides organiques

Les bactéries lactiques utilisées en fermentation sont sélectionnées pour propriétés acidifiantes, phénomène déterminant dans l'inhibition des flores pathogènes (comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium*) et des bactéries d'altération (*Pseudomonas* et les entérobactéries) (Smith et Palumbo, 1983).

L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution du pH du milieu et aussi à la fraction acide non dissociée. La diminution du pH entraîne une acidification du cytoplasme cellulaire qui se traduit par une inhibition de la croissance microbienne (Kashket, 1987).

· **L'acide lactique** : c'est le métabolite majeur de la fermentation des bactéries lactiques, dont ses deux formes dissociées et non dissociées, sont en équilibre, et le niveau de dissociation dépend du pH. À pH bas, une grande quantité de l'acide lactique se trouve sous forme non dissociée et il est toxique pour de nombreuses bactéries, levure et moisissures. Cependant, la sensibilité des microorganismes à cet acide est très variable. (Yang, 2000). En plus, les stéréo-isomères de l'acide lactique diffèrent également dans leur activité antimicrobienne, l'acide L-Lactique étant plus inhibiteur que l'acide D-Lactique (Benthin et Villadsen, 1995).

· **L'acide acétique** : Il est produit par les souches de bactéries lactiques par voie hétéro-fermentaire, pourrait interagir avec la membrane cellulaire et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation des protéines (Huang et al, 1986). L'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique à l'égard de *Listeria monocytogenes* (Ahamed et Marth, 1989). En effet, du fait que cet acide a un pKa de (4,76), plus élevé par rapport au pKa des autres acides (lactique et citrique), cet acide pourrait s'accumuler dans le cytoplasme des cellules à des concentrations plus élevées que les autres acides ; inhibant ainsi les levures, les moisissures et les bactéries (Blom et Mortvedt, 1991).

III.3.2. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Il est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène, par action d'oxydases à flavoprotéines ou d'une peroxydase à NADH. Le H₂O₂ présente un effet inhibiteur comme l'a montré Wheeler et ses collaborateurs, dès 1952. Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du H₂O₂ en eau et en oxygène. Le H₂O₂ produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (Condon, 1987). L'action inhibitrice du peroxyde et d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les porteurs cellulaires (Caplice, 1999). Le H₂O₂ pourrait également être un précurseur pour la production de

radicaux libres bactéricides tels que l'ion superoxyde (O₂⁻) et l'hydroxyle (-OH) qui peuvent endommager l'ADN (Byezkowski et Gessner, 1988). Dans le lait cru, l'H₂O₂ active le système de la lactoperoxydase, produisant de l'hypothiocyanate (OSCN⁻), et des produits d'oxydation intermédiaires qui sont inhibiteurs d'un grand nombre de bactéries à gram positif et à gram négatif (Reiter et Harnulv, 1984). Seifu et al (2004) ont montré dans leur

étude que l'activation du système lactoperoxydase pourrait contribuer au contrôle de *L. monocytogenes* dans le lait.

III.3.3. Le dioxyde de carbone (CO₂)

Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois le dioxyde de carbone (CO₂) peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (Lindgreu et Dobrogoz, 1990).

III.3.4. Les composés aromatiques

Parmi ceux produits par les bactéries lactiques, le diacétyl et l'acétaldéhyde sont majoritaires. Selon Vinderola et al (2002), ces composés ne sont pas des inhibiteurs de la croissance des ferments lactiques ou des souches probiotiques aux concentrations généralement produites dans le lait et les fromages.

- **Le diacétyl** : c'est un produit issu du métabolisme du citrate, et qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. L'effet antimicrobien du diacétyl a été connu depuis les années 30 (Jay, 1982). Il inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif en interagissant avec une protéine fixatrice d'arginine, ce qui affecte l'utilisation de l'arginine (Jay, 1986). Ce même auteur montra que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif. Le diacétyl à 200 µg/ml inhibent les bactéries à Gram négatif, mais inhibent celles à Gram positif à 300 µg/ml. La production de diacétyl est faible durant la fermentation lactique, 4 µg/ml sont produits par *Lactococcus lactis ssp.lactis biovar diacetylactis*, et les niveaux acceptables de diacétyl sont de 2 à 7 µg ml⁻¹ ; son utilisation pratique en tant que conservateur alimentaire est limitée ; cependant, le diacétyl pourrait agir en synergie avec d'autres facteurs antimicrobiens et contributeur aux systèmes de conservation combinés dans les aliments fermentés (Jay, 1986).
- **Acétaldéhyde** : Il est produit par *Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus* par action d'une aldolase à thréonine qui clive la thréonine en acétaldéhyde et glycine. Etant donné que la bactérie *Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus* et *Sc.thermophilus* ne métabolisent pas l'acétaldéhyde, dans la Yaourt il s'accumule dans le produit à une concentration de 25 ppm. L'Acétaldéhyde à 10-100 ppm inhibe la croissance de *S aureus*, *salmonella typhimurium* et *E .coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

III.3.5. Acides gras

Sous certaines conditions, certains lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques pourraient produire des quantités significatives d'acides gras libres dans le lait fermenté (Rao et Reddy, 1984).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été reconnue depuis plusieurs années. Les acides gras instauréssont actifs à l'égard des bactéries à Gram positif, et l'activité antifongique des acides gras est dépendante de la longueur de la chaîne carbonée, concentration et pH du milieu. On pense que l'action antimicrobienne des acides gras est due aux molécules non dissociés et non à l'anion, étant donné que le pH a des effets profonds sur leur activité avec un effet bactéricide rapide à bas pH (Kabara, 1993). La sensibilité aux acides gras varie considérablement parmi les espèces. L'acide arachidonique

aurait un effet bactéricide contre les bactéries à Gram positif dont *L.monocytogenes* (Knapp et Melly, 1986).

Wang et Johnson (1992) ont montré, dans leur étude, la sensibilité in vitro de *L.monocytogenes* à de nombreux acides gras habituellement présents dans la matière grasse du lait et selon ces auteurs, il serait possible de développer un système antimicrobien basé sur les acides gras pour l'inhibition de *L. monocytogenes* dans les aliments (Bendali, 2008).

III.3.6. Les bactériocines

Les bactériocines sont des produits de la synthèse ribosomique bactérienne libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée. Elles possèdent une activité bactéricide à large spectre (Jack et al, 1995).

Plusieurs bactéries lactiques sont connues pour être capable de produire deux ou plusieurs bactériocines. Des analyses de structure ont confirmé que certaines de ces bactériocines sont des peptides entièrement différents (Quadri et al, 1994) Cité par Bendali. Cette définition exclut la substance à activité antimicrobienne produite par *Lactobacillus reuteri*, la reutérine (3-hydroxypropionaldéhyde), de la famille des bactériocines car cette molécule est (i) non protéique, (ii) capable d'inhiber également les virus, les champignons, et les protozoaires (Caplice et Fitzgerald, 1999). La capacité à produire des substances antimicrobiennes de type bactériocine est un phénomène commun à de nombreux microorganismes isolés d'aliments fermentés. Un grand nombre de bactériocines ont été caractérisées chez les bactéries lactiques ; elles sont classées dans trois groupes distincts suivant leurs différences structurales (Cleveland et al, 2001).

- La classe I (l'antibiotique) comprend des petits peptides modifiés de façon post transcriptionnelle qui sont caractérisés par la présence d'acides aminés thioesters modifiés.
- La classe II est composée de peptides non modifiés thermostables.

La classe III comprend quand à elle les bactériocines thermolabiles. La plupart des bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores de la membrane de la bactérie cible (O'sullivan et al, 2002).

Certaines bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*, *Pediococcus* sont capables de produire des molécules à activité antifongiques.

IV. Métabolisme des bactéries lactiques

IV.1.Voies fermentaires des bactéries lactiques

Le lactose est le sucre fermentescible du lait. Il est transporté par un système perméase, après sa pénétration dans la cellule, il sera coupé par une β -Galactosidase pour donner du glucose et du galactose (figure 3).

Le principal produit final de la dégradation du lactose est le « lactate » auquel peut s'ajouter l'acétate, l'éthanol et le gaz carbonique pour les espèces hétéro-fermentaires (Mameche Doumandji, 2008).

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 3). Il s'agit des voies homo-fermentaires (Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) et hétéro-fermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces, selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose.

Les bactéries homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C_3) par glucose (C_6) consommé. Chez les hétérofermentaires, les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. Les, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C_2 est produite (en général, soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène.

La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO_2 . Beaucoup de *Lactobacillus* homofermentaires produisent normalement, en dehors de l'acide lactique, du formate, de l'éthanol et de l'acétate ; Il ne s'agit pas d'une déviation vers la voie des pentoses mais une partie du pyruvate est transformée en acétyl CoA. En condition d'excès de nutriments, le pyruvate est converti en lactate, mais en condition de carence, une partie de pyruvate est métabolisée en éthanol et acétate.

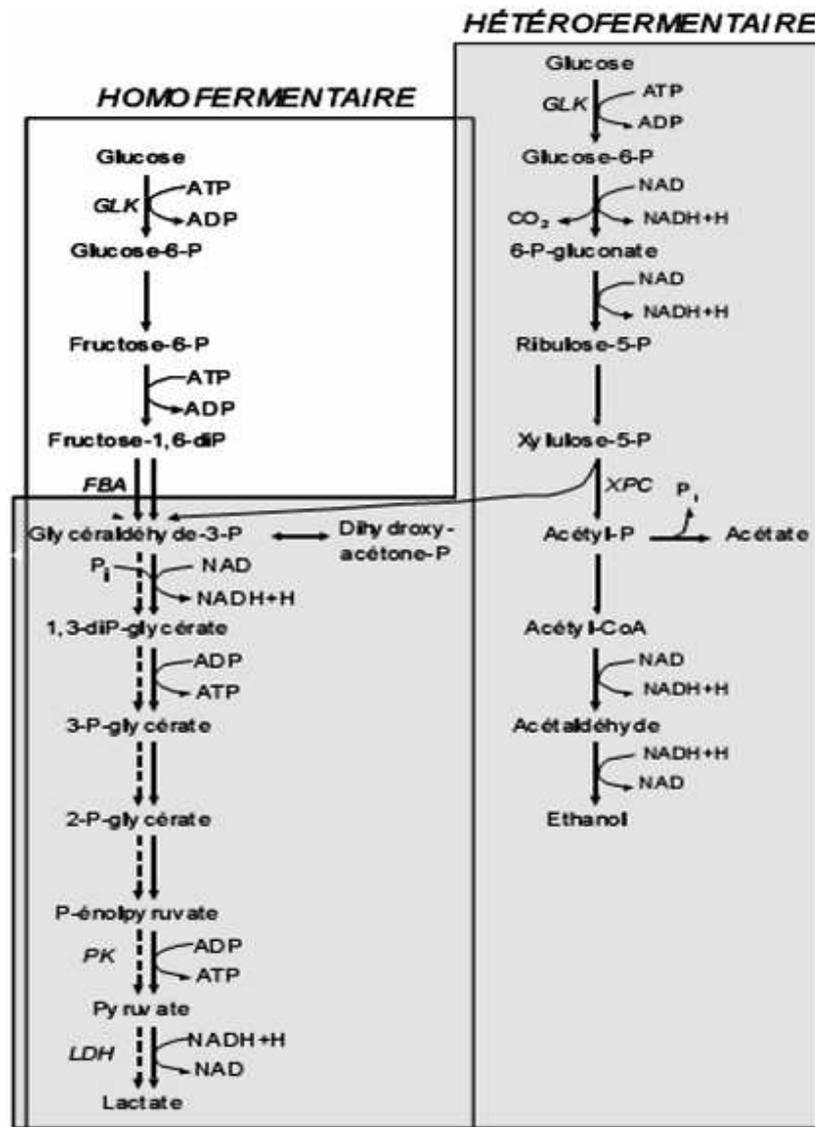


Figure 3. Voies homo-fermentaire et hétéro-fermentaire de la dégradation du glucose (Raynaud, 2006).

Les principales enzymes sont indiquées en italique : *GLK* : glucokinase, *FBA* : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *XPC* : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, *PK* : pyruvate kinase, *LDH* : lactate déshydrogénase

IV.1.1. Voie homo-fermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homo-fermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols (figure 4). Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation

carbone...etc.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO₂d'acétate et d'éthanol (Cocaign-Bousquet et al, 1996).

IV.1.2. Voie hétéro-fermentaire ou PPC (Pentose phospho-cétolase)

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétéro-fermentaires (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles.

Le métabolisme hétéro-fermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homo-fermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP.

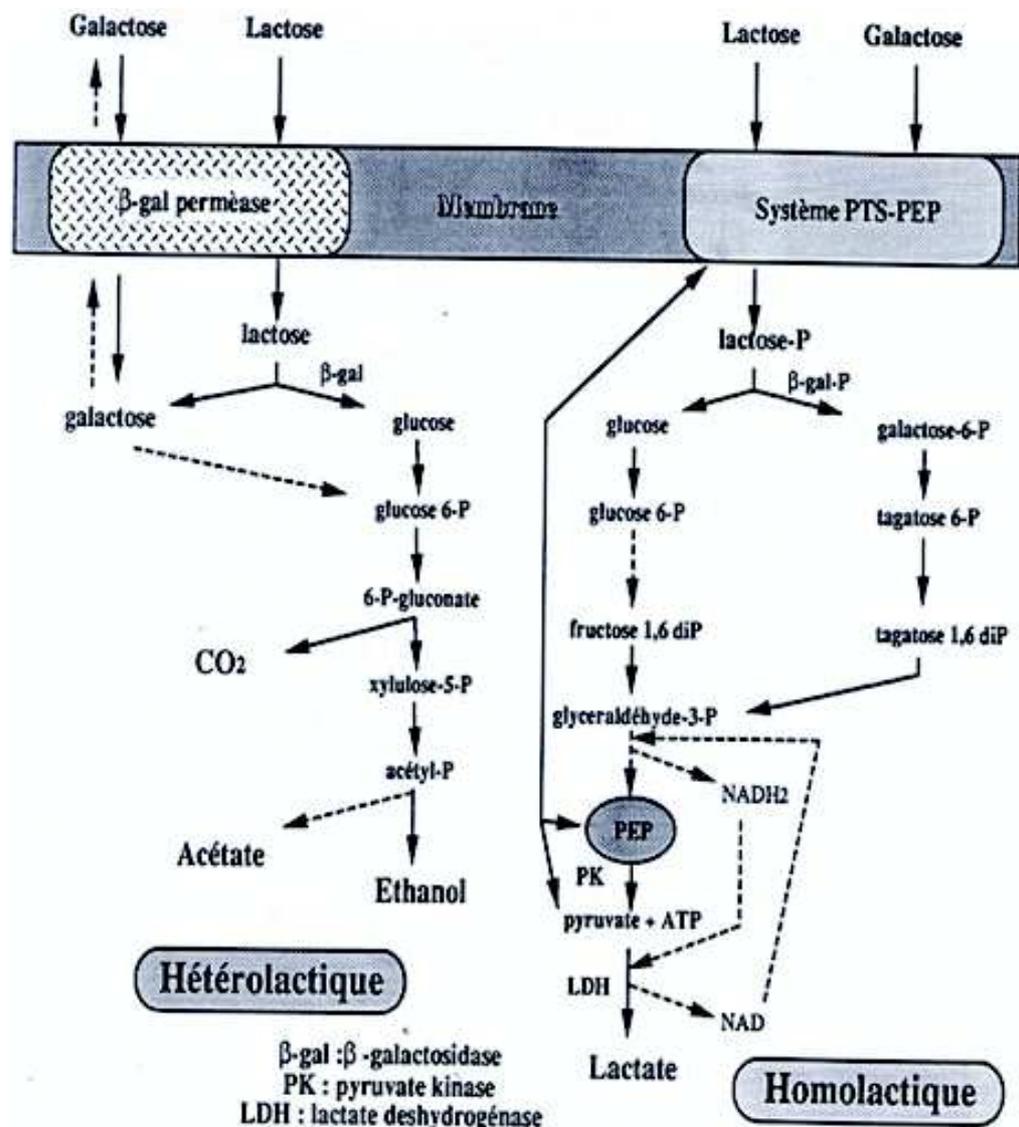


Figure 4. Transport et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques.

(Thompson et Gentry-Weeks, 1994 cité par Djidal, 2007)

IV.2. Métabolisme des sucres chez les lactocoques

Dans les procédés de fermentation alimentaire, une des bactéries lactiques les plus étudiées est *Lactococcus lactis*. C'est une bactérie homo-fermentaire et mésophile, son utilisation dans l'industrie alimentaire et plus particulièrement dans la fabrication du fromage la confronte à différentes sources de carbone. Différentes voies cataboliques sont impliquées dans l'utilisation du glucose, du lactose qui sont la source de carbone principale du lait, et du citrate également présent en milieu laitier (Christensen et al, 1999).

Les lactocoques utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse et convertissent le pyruvate en acide lactique. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétro inhibition. Le Co-métabolisme du citrate peut être observé chez certaines espèces lors de la fermentation des sucres (EMP) (Christensen et al, 1999).

IV.3. Métabolisme du citrate

Malgré sa concentration relativement faible dans le lait (~ 8-9 mM), le citrate est un constituant clef pour la formation du diacétyle, un composé volatil à l'arôme de beurre important dans les laits fermentés et les fromages frais. Environ 90% du citrate du lait est soluble et majoritairement perdu dans le lactosérum. (Aarnikunnas, 2006 cité par Meziane, 2009).

L'acide citrique est utilisé par de nombreuses espèces des genres (*Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (*Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*), *Enterococcus* (*Ec. faecium*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* (*Ln. lactis*, *Ln. cremoris*) et *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*). Cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote (Leveau et Bouix, 1993).

De nombreux auteurs ont montré la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique de différents milieux, par des espèces appartenant notamment au genre *Lactococcus*. Kempler et Mc Kay (1979) ont montré que la capacité de transport du citrate est liée à la présence d'un plasmide de 7,9 Kb chez toutes les souches analysées fermentant le citrate, qui appartiennent donc au biovar diacetylactis (Boumerdassi et al, 1997). Le métabolisme du citrate (figure 5) est, chez *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc*, une voie secondaire de production (Marty-Teyssset et al, 1996).

La citrate perméase est essentielle au métabolisme du citrate et possède une zone étroite de pH optimal, située entre 4.5 et 5.5 (Garcia-Quintâns et al, 1998). Certains auteurs ont rapporté une zone optimale de 5.5 à 6.0 (Smith et al, 1992).

Une fois à l'intérieur de la cellule, une ligase, la citrate lyase (CL) ou citritase assure la conversion du citrate en oxaloacétate et en acétate (Harvey et Collins, 1962). L'oxaloacétate est par la suite converti en CO₂ et pyruvate par l'enzyme oxaloacétate déshydrogénase (OADH). La formation de l' α -acétolactate est effectuée en 2 réactions distinctes catalysées par l'enzyme l' α -acétolactate synthase (ALS). Avec la thiamine pyrophosphate (TPP) agissant à titre de coenzyme, une molécule de pyruvate est premièrement décarboxylée, résultant en la formation d'hydroxyéthyl-TPP ou acétaldéhyde actif. Cet intermédiaire réagit ensuite avec une seconde molécule de pyruvate, assurant la formation d' α -acétolactate. Celui-ci est subséquemment décarboxylé en acétoïne par l' α -acétolactate décarboxylase

(ALD) ou de façon oxydative en diacétyle. L'acétoïne et le diacétyle produits peuvent par la suite être respectivement réduits en 2,3-butanediol ou acétoïne par les réductases. L'acétate, le formate, l'éthanol et le lactate sont également formés en quantité variée à partir du pyruvate via les enzymes pyruvate formate lyase (PFL), pyruvate déshydrogénase (PDH) et lactate déshydrogénase (LDH) (Hugenholtz, 1993).

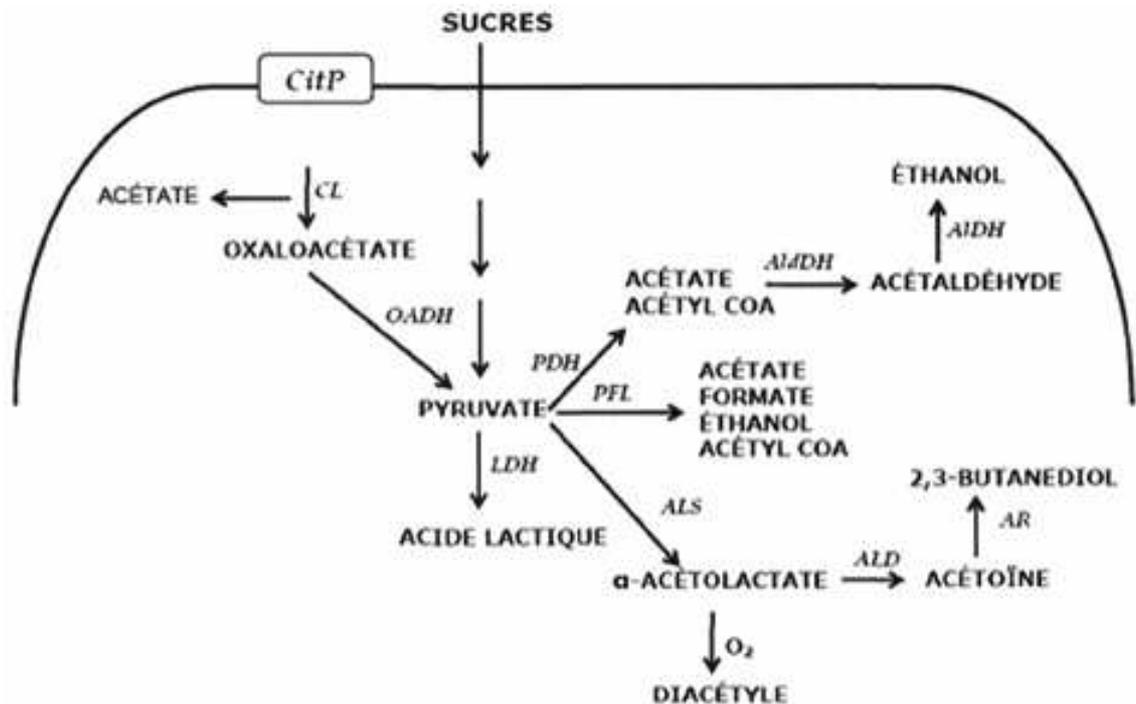


Figure 5. Métabolisme du citrate chez *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Swindell et al, 1996)

Description des enzymes ou étapes :

CitP, citrate perméase; **CL**, Citrate lyase; **OADH**, oxaloacétate déshydrogénase; **LDH**, lactate déshydrogénase; **PDH**, pyruvate déshydrogénase; **PFL**, pyruvate formate lyase; **ALS**, α -acétolactate synthase; **ALD**, α -acétolactate décarboxylase; **AldDH**, alcool déshydrogénase; **AldDH**, aldéhyde déshydrogénase; **DR**, diacétyle réductase; **AR**, acétoïne réductase; **O₂**, décarboxylation oxydative du diacétyle (réaction non enzymatique).

L'enzyme ALS présente un pH optimal voisin de 5,5 et une faible affinité pour le pyruvate, ce qui nécessite une concentration interne importante de ce composé pour la formation de l' α -acétolactate. Ceci expliquerait pourquoi la présence de composés aromatiques n'est observée qu'en présence d'un excès de ce composé.

L'ALD serait parfois limitante, expliquant ainsi l'accumulation de son substrat dans le milieu (Divies et al, 1994). Chez *L. lactis*, cette enzyme est également impliquée dans le contrôle de la biosynthèse des acides aminés à chaînes ramifiées et est fortement activée par la présence de leucine, valine et isoleucine (Phalip et al, 1994).

Il a été observé chez certaines souches que la décarboxylation de l' α -acétolactate en diacétyle et acétoïne était concomitante à l'incorporation du citrate, alors que chez d'autres, la décarboxylation était effectuée à taux variés après accumulation cellulaire de l' α -acétolactate (Verhue et Tjan, 1991). La décarboxylation oxydative de ce composé est aujourd'hui considérée comme étant la voie principalement responsable de la production

nette de diacétyle chez *L. lactis* et cette production dépend ultimement de la capacité des souches à accumuler l'a-acétolactate.

Plusieurs stratégies visant une production accrue de diacétyle par *L. diacetylactis* ont été étudiées. Celles-ci concernent principalement une redirection des voies du catabolisme du pyruvate et visent ultimement l'accumulation d'une plus grande quantité d'a-acétolactate pour la production de diacétyle. (Hugenholtz et al, 2000).

IV.4. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

IV.4.1. Besoins azotés

En général, les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés à partir d'une source d'azote simple, et doit faire appel à des sources exogènes pour assurer le métabolisme. Six acides aminés sont essentiels à la croissance des bactéries lactiques soient : l'acide glutamique, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine et l'histidine (Coaign-Bousquet et al, 1995).

La plupart des autres acides aminés sont non essentiels, mais simulant leur croissance, c'est le cas pour la phénylalanine et la proline (Monnet et Gripon, 1994). Les acides aminés peuvent être sous forme de peptides, d'ailleurs Payne (1980) a montré que l'utilisation des acides aminés provenant des peptides est généralement plus efficace que celles des acides aminés libres.

IV.4.2. Besoins en vitamines

Les vitamines jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire, les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser des vitamines (Desmazeaud et De Roissart, 1994), d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture. Les besoins vitaminiques des lactobacilles et des lactocoques sont plus complexes. Toutes les espèces ont un besoin absolu en pantothénate de calcium, en niacine, en riboflavine et en biotine (Ledesma et al, 1977) (Tableau 7).

Vitamines	<i>Lactobacillus sp.</i> (Desmazeaud et de Roissart, 1994)	<i>Lactococcus sp. Lactis</i> (Marshall et Law, 1984)
B12	+/-	+
Biotine	+	+
Niacine	+	+
Pantothénate	+	+
Riboflavine	+	+
Thiamine	-	+
Pyridoxal	+	+
Acide folique	+/-	+

Tableau 7. Les exigences vitaminiques pour *Lactobacillus sp* et *Lactococcus sp. Lactis*

IV.4.3. Besoins en ions

Peu de travaux ont été réalisés sur l'influence des minéraux (Boyaval, 1989). Il a été montré cependant, que les ions Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mo^{4+} , Se^{4+} interviennent dans la nutrition des lactocoques (Reiter et Moller-Madsen, 1963) et les ions Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} dans la nutrition des lactobacilles (Tuli et al, 1985). Le magnésium stimule la croissance des bactéries lactiques et la production d'acide lactique. Amouzou et al (1985) ont montré le rôle de Mg^{2+} sur *Lactococcus.lactis.subsp.Lactis*. La forme ionisée entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres. Il intervient aussi comme activateur d'un grand nombre de réaction enzymatique du métabolisme et comme stabilisateur de la structure des acides nucléique et l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire.

Le manganèse est nécessaire à l'activité de nombreux enzymes dont l'ARN polymérase, la LDH, la NADH oxydase (Archibald, 1986). Les effets biologiques du manganèse sont associés à trois fonctions :

- La structure et au fonctionnement des enzymes en tant que coenzyme.
- A la détoxification des cellules mises en présence d'oxygène. Mn^{2+} se substituerait à la superoxyde dismutase pour évacuer les radicaux superoxydes.
- A la stabilisation des organites cellulaires, en particulier Mn^{2+} stabilise la conformation native des ribosomes, la membrane et la paroi bactérienne.

Le calcium est souvent cité par son rôle dans la paroi cellulaire en particulier pour l'activité des protéases de paroi. Thomas et Pritchard (1987) ont montré que des sérine-protéases de *Lactococcus.lactis.subsp.lactis* sont activées par le Ca^{2+} . Cette propriété est attribuée soit à la fixation de l'enzyme sur la paroi, soit à la stabilisation de son activité, soit à la modification de la structure de la paroi.

V. Fermentation lactique en fromagerie

V.1. La fermentation du lactose et la production d'acide lactique dans la fabrication des fromages

V.1.1. Fermentation lactique et ses conséquences

La fermentation lactique commerciale remonte à l'an 1881, et les caractéristiques des bactéries lactiques sont bien reconnues. Ces bactéries anaérobies peuvent être homo-fermentaires ou hétéro-fermentaires. Et certaines espèces sont capables à croître à des températures au-dessus de 40°C et à un pH entre 5 et 7. L'acide lactique produit, peut avoir les formes stéréo-isomériques -D ; -L ou -DL (Tsai et al, 1993).

Les principales fonctions des bactéries lactiques, lors de la fermentation du lait, sont le métabolisme du lactose en acide lactique, la production des composés d'arôme, et dans le cas des fromages, la modification de la texture.

La fermentation lactique a plusieurs conséquences dans la production et la maturation du fromage en affectant directement ou indirectement son arôme (Olson, 1990). Ces conséquences sont les suivantes :

- La fermentation et la réduction de la teneur en sucres fermentescibles qui contrôlent la croissance et la composition des flores secondaires.
- La création d'un bas potentiel d'oxydation-réduction au début des stades de maturation du fromage.
- La compétition et la synergie avec les flores secondaires pendant la fabrication et au début des stades de maturation.
- La protéolyse.
- L'humidité et la texture.

V.1.2. Les cultures lactiques mésophiles employées dans la production de fromage frais

Les fromages frais résultent de la fermentation lactique du lait à partir d'une culture mixte de lactocoques et de leuconostocs. Ces bactéries lactiques sont acidifiantes car elles métabolisent le lactose en acide lactique et elles sont aussi aromatisantes et elles peuvent métaboliser le citrate en divers composés d'arômes (Azari, 1999).

Différentes espèces de bactéries lactiques sont utilisées pour la maturation en crèmerie. Selon Paquot et al (1994), les bactéries lactiques mésophiles sont formées de souches homo-fermentaires (*Lactococcus*) et hétéro-fermentaires (*Leuconostoc*). Les *Ln cremoris* et *Lc. diacetylactis* sont utilisées afin de produire du diacétyle, substance principale de l'arôme du beurre comme le montre le (tableau 8).

Organisme	Type fermentaire		Isomères de l'acide lactique	Utilisation du citrate	Diacétyle à partir du citrate	Hydrolyse de l'arginine
	Homo	Hétéro				
<i>Lc. Diacetylactis</i>	+	-	L(+)	+	+	+
<i>Lc. Lactis</i>	+	-	L(+)	-	-	+
<i>Lc. Cremoris</i>	+	-	L(+)	-	-	-
<i>Ln. Cremoris</i>	-	+	D(-)	+	+	-

Tableau8. Caractéristiques différentes espèces de bactéries lactiques utilisées pour la maturation en crèmerie

(Azari, 1999).

Les cultures lactiques généralement employées dans la production de fromage frais sont de type DL, ce qui signifie que *Lactococcus lactis subsp. lactisbiovar. diacetylactis* et *Leuconostoc spp.*, qui sont des bactéries aromatiques produisant des composés organiques volatils à partir du citrate, sont présentes dans le ferment. Les bactéries *Lactococcus lactis subsp. lactis* et *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, qui produisent de l'acide lactique à partir du lactose, sont utilisées dans le ferment comme bactéries acidifiantes (Cogan et Jordan, 1990).

Les lactocoques sont des bactéries en forme de coques et dont le métabolisme est homo fermentaire c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique L(+). Les

leuconostocs qui sont des bactéries en forme de coques, et qui utilisent la voie hétéro-fermentaire pour convertir le glucose en acide lactique, en éthanol et en gaz carbonique. En plus de produire des composés aromatiques à partir du citrate, les leuconostocs réduisent l'acétaldéhyde produit par les lactocoques en éthanol ce qui permet d'éviter les défauts de saveurs généralement attribués à une trop grande concentration d'acétaldéhyde (Keenan et al, 1966).

Fox et al (1990) ont révisé la glycolyse et les réactions reliées pendant la production et la maturation du fromage. Selon ces auteurs, pendant la phase de maturation, la production de l'acide lactique est aussi altérée principalement par l'intermédiaire de l'action des bactéries non fermentaires. Les principaux changements sont les suivants :

- La conversion de L- lactate à D- lactate comme un mélange existant dans la plupart de fromages à la fin de la maturation.
- Dans les fromages type Suisse, le L- lactate est métabolisé en propionate, en acétate et en CO₂, composés responsables de la formation des trous et de la saveur typique de ces fromages.
- Sur la surface moisie et probablement en surface du fromage mature, le lactate est métabolisé en CO₂ et H₂O, ceux-ci contribuent à l'augmentation du pH qui caractérise ces fromages et en même sont responsables de changements de texture.
- Dans les fromages Cheddar et de type hollandais, du lactate peut être oxydé en acétate par des pédiocoques.

V.1.3. L'arôme des fromages et l'activité bactérienne

La flaveur des fromages est une sensation complexe qui comprend l'arôme, le goût et la texture. Bien que plusieurs auteurs aient tenté d'élucider la nature des composantes chimiques qui forment la saveur de certains fromages, elle résulte assurément de la délicate balance existant entre une multitude de composantes qui contribuent à la saveur fromagère (Forde et Fitzgerald, 2000). Plus de 600 composés aromatiques ont jusqu'ici été identifiés par chromatographie en phase gazeuse (Curioni et Bosset, 2002). Alors que la saveur des fromages matures est complexe et résulte de la présence et de l'interaction d'une quantité élevée de composés aromatiques, la saveur typique des fromages frais et laits fermentés est généralement associée à la présence d'une quantité plus limitée de composés comme le lactate, l'éthanol, l'acétate, l'acétaldéhyde, le 2,3-pentanedione et le diacétyle.

La contribution des bactéries lactiques à la saveur des fromages a fait l'objet de nombreuses études (Muir et al, 1996 ; McSweeney et Sousa, 2000).

Les principales molécules aromatiques du fromage sont produites par ces bactéries selon différentes voies métaboliques : la glycolyse , lipolyse et la protéolyse, associée principalement à l'étape de maturation du fromage (Edima, 2007).

V.1.3.1. La glycolyse

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages. Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (McSweeney et Sousa, 2000).

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait, disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%. La figure 6 présente les principales voies de la glycolyse chez ces bactéries.

Le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoénol pyruvate dépendant (système PEP-PTS) chez les lactocoques.

Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée. Suite à leur transport dans la cellule les composés glucidiques libres ou modifiés sont catabolisés selon 3 voies; la voie glycolytique principale de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du D-tagatose-6-phosphate ou la voie de Leloir (Desmazeaud, 1983).

V.1.3.2. La lipolyse

L'activité lipasique, relativement faible chez les ferments lactiques, contribue à l'élaboration de la flaveur des fromages lors de la maturation (Oison, 1990 ; Kamaly et Marth, 1989). L'hydrolyse des triglycérides est la transformation biochimique principale du gras fromager pendant la maturation et conduit à la formation des acides gras libres, mono et diglycérides et probablement du glycérol (Singh et al, 2003). Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Ces derniers dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de métylcétones, alcools, lactones et esters (McSweeney et Sousa, 2000). La figure 10 présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés.

Tel que rapporté par Talon et Montel (1994), les estérases et lipases microbiennes sont des enzymes intracellulaires dont les activités sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance et dépendent des milieux de culture. Il a été observé que les milieux à base de lait stimulaient la production de ces enzymes chez les lactocoques et que l'addition de glutathion augmentait l'activité estérasique des sous espèces *lactis* et *cremoris*. Cette dernière démontrait une plus grande activité estérasique que la sous espèce *lactis* (Gagnon, 2006).

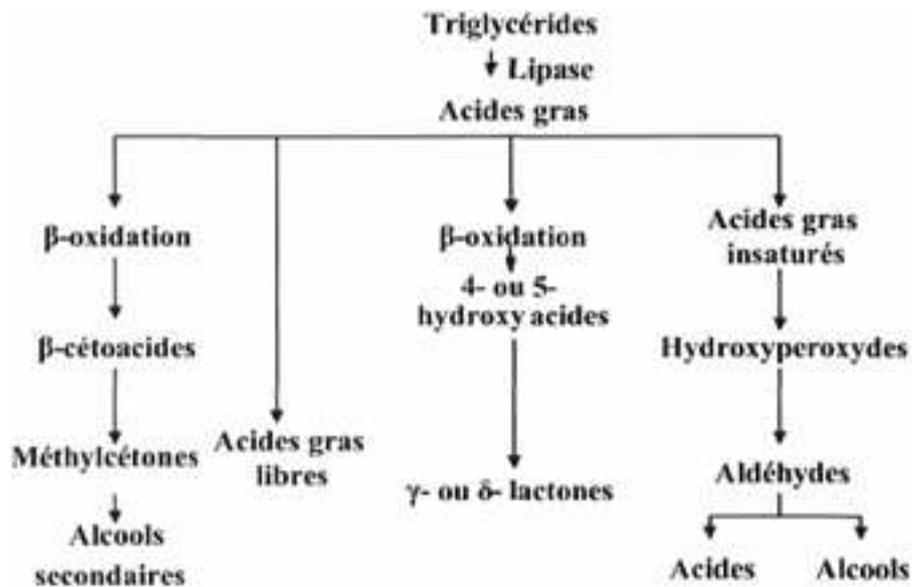


Figure 6. Principales voies de la lipolyse

(McSweeney et Sousa, 2000)

V.1.3.3. La protéolyse

La protéolyse est considérée comme étant l'événement biochimique le plus important durant la maturation fromagère. Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, les protéases indigènes du lait (la plasmine) et les enzymes du ferment et de la flore secondaire (Lane et Fox, 1997).

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997).

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Kamaly et Marth, 1989). Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides.

Des études comparatives effectuées sur la protéolyse du cheddar fait avec ou sans ferments lactiques ont démontré l'importance de ces bactéries pour la libération de petits peptides et d'acides aminés libres durant la maturation fromagère (Lane et Fox, 1996 ; Lynch et al, 1997).

Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés. Les voies cataboliques responsables de cette conversion sont principalement les voies initiées par les réactions d'élimination et de transamination impliquant une quantité variable d'enzymes : lyases, décarboxylases, désaminases et transaminases (Yvon et Rijnen, 2001).

V.2. Production d'arômes par les bactéries lactiques

V.2.1. Les composés d'arômes : Définition

Les arômes sont des molécules de petite taille (< 400 Da) appartenant à de nombreuses classes chimiques, leurs propriétés communes d'être volatiles dans l'atmosphère gazeuse et odorantes dans des conditions normales de pression et de température (Richard, 1992).

Le nombre de composés d'arômes dans un produit alimentaire est variable, et généralement de l'ordre de plusieurs centaines.

Tous ces composés ne jouent pas le même rôle. Certains sont nécessaires à la note caractéristique du produit : on les appelle des composés clés de l'arôme, ces molécules clés de l'arôme sont importantes pour la formulation d'un arôme simplifié.

Les composés d'arôme sont présents en faible concentration dans le produit (du ng/kg au mg/kg) et peuvent interagir avec les composants de la matrice alimentaire. Ils n'apportent aucune contribution énergétique aux aliments dans lesquels ils se trouvent mais jouent un rôle fondamental dans la perception des aliments et le plaisir que procure leur dégustation.

Ainsi, l'arôme d'un produit alimentaire est un critère essentiel de la qualité organoleptique déterminant les choix et les préférences des consommateurs (Atlan, 2007).

V.2.2. Les arômes produits par les bactéries lactiques

Un nombre important d'articles dans la littérature explique la fonction des bactéries lactiques dans la production de saveur des produits laitiers (Seitz, 1990). Dans les produits laitiers fermentés l'acide citrique est considéré comme étant le principal précurseur de la formation des composés d'arôme tel l'acétate, l'acétoïne et le diacétyl (Diviès et al, 1994).

Lindsay et al (1965) ont remarqué que 1,6 à 4,0 ppm de diacétyl sont nécessaires afin de donner un goût plaisant aux produits laitiers fermentés tandis qu'un surplus d'acétaldéhyde donne un goût de verdure considéré comme un défaut de saveur (Baron, 1998).

Bien que le diacétyl et l'acétaldéhyde soient les composés organiques ayant le plus d'importance en ce qui a trait à la saveur des produits laitiers fermentés, d'autres composés organiques tels que l'acide acétique et l'éthanol sont aussi importants pour l'obtention d'un produit ayant une saveur agréable (Vedamuthu, 1988).

L'association entre les bactéries acidifiantes et les bactéries aromatiques est nécessaire pour la production de composés aromatiques. En effet, des études physiologiques ont montré que la production d'acide par les lactocoques est nécessaire avant que les bactéries aromatiques puissent convertir le citrate en composés aromatiques (Foster et al, 1957 cité par Baron, 1998).

V.2.2.1. Utilisation du citrate par les bactéries aromatiques

Les lactococcus. *lactis subsp. diacetylactis*, et les leuconostocs ne peuvent utiliser le citrate comme source unique d'énergie, mais ils sont capables de métaboliser le citrate en présence d'un sucre fermentescible.

En présence de citrate et de lactose, les bactéries lactiques aromatiques produisent plus de pyruvate qu'il est nécessaire pour régénérer le coenzyme réduit. Cet excès de pyruvate, toxique pour la cellule, est éliminé sous forme de produits neutres tels que l'acétoïne et le diacétyl (Harvey et Collin, 1963). Dans du lait ou dans un bouillon contenant du citrate, *S. lactis subsp. diacetylactis* produit du diacétyl, de l'acétoïne et consomme le citrate dès que la croissance commence. La quantité maximale de diacétyl formé peut

atteindre $8\mu\text{g/ml}$, mais elle varie beaucoup (moyenne : 3 à $4\mu\text{g/ml}$). La quantité d'acétoïne formée se situe habituellement autour de $200\mu\text{g/ml}$ encore que certaines cultures puissent en produire $300\mu\text{g/ml}$. La somme des quantités d'acétoïne et de diacétyle formés atteint son maximum au moment où le citrate est complètement épuisé (figure 7), ensuite, la production d'acétoïne est négligeable tandis que la teneur en diacétyle décroît en raison, vraisemblablement, de l'activité de la diacétyle réductase.

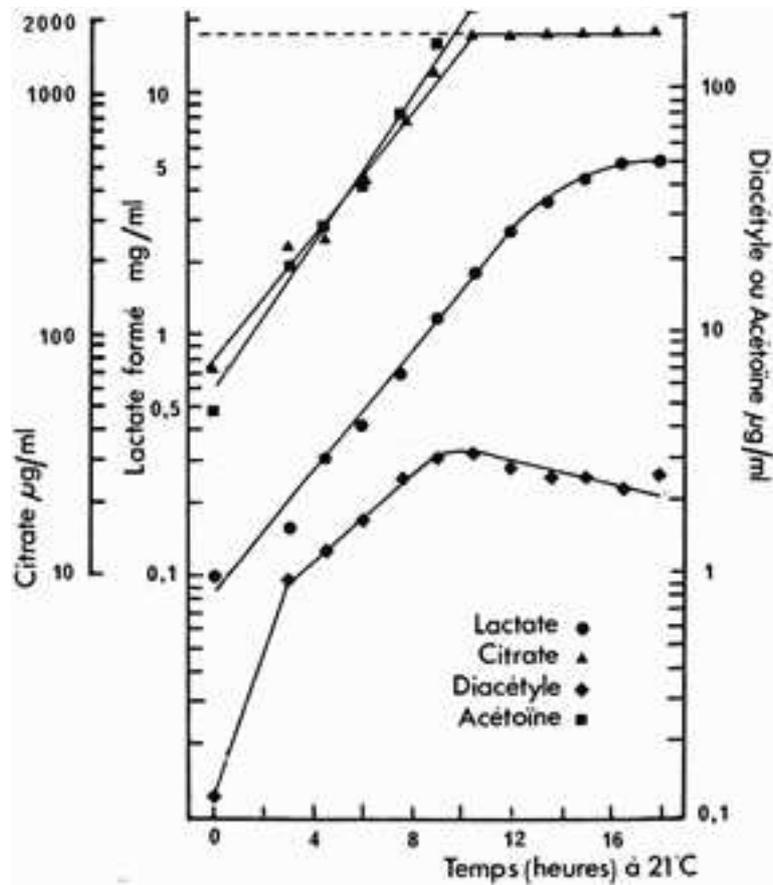


Figure 7. Formation du diacétyle et de l'acétoïne et dégradation du citrate, au cours de la croissance de *S. lactis subsp. diacetylactis* DRC 1 dans du lait, à 21°C (Cogan, 1980).

Dans du lait, les levains des types DL ou D métabolisent le citrate et produisent diacétyle et acétoïne d'une façon comparable aux cultures pures de *S. lactis subsp. diacetylactis*. Les teneurs maximales en diacétyle et en acétoïne coïncident avec la disparition du citrate. La teneur maximale en diacétyle peut atteindre $12\mu\text{g/ml}$ mais elle varie beaucoup, la moyenne se situant à $4\text{-}5\mu\text{g/ml}$ (Tofte-Jespersen, 1974).

Les levains L produisent au maximum $5\mu\text{g/ml}$ de diacétyle et $85\text{-}100\mu\text{g/ml}$ d'acétoïne. Une comparaison de la production de diacétyle et d'acétoïne au cours de la croissance des levains DL et L est présentée sur la figure 8.

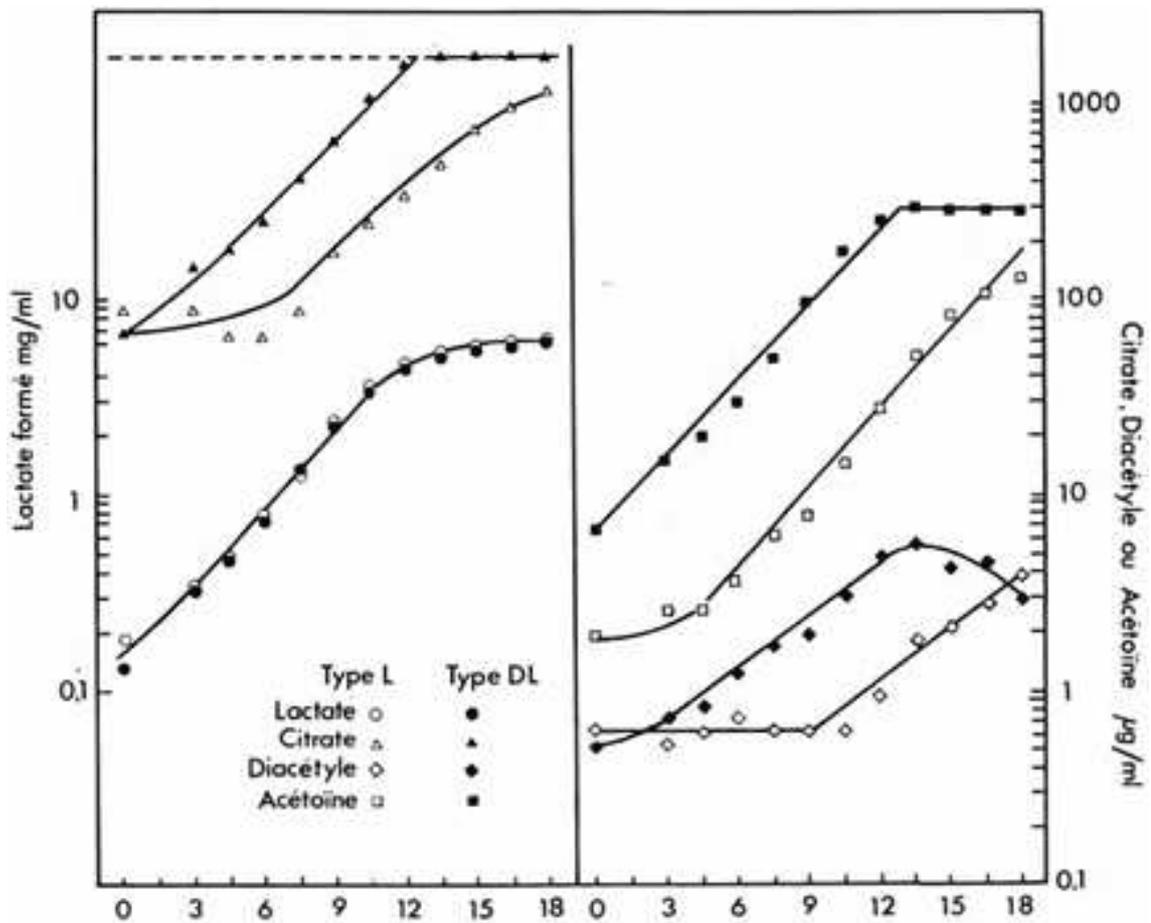


Figure 8. Etude comparée d'un levain DL et d'un levain L : formation du diacétyle, de l'acétoïne et du lactate ; dégradation du citrate (Cogan, 1980).

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, comme *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacétylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyle, acétoïne, 2,3-butanediol et α -acétolactate .

L' α -acétolactate est formé à partir de deux molécules de pyruvate par l' α -acétolactate synthase. Ce composé est instable et peut être décarboxylé soit chimiquement en présence d'oxygène en diacétyle, soit enzymatiquement par l' α -acétolactate décarboxylase en acétoïne.

Hugenholtz (1993) a révisé les voies métaboliques impliquées dans la formation des produits issus du citrate. Selon cet auteur, la production du diacétyle par les bactéries lactiques homo-fermentaires est sujette aux cinq stratégies d'ingénierie métabolique suivantes (figure 9).

Stratégie 1 : L'inactivation du lactate déshydrogénase (LDH) par l'excès limité du lactose par le NADH peu élevé, par la mutation ou l'ingénierie génétique.

Stratégie2 : L'inactivation de pyruvate formiate lyase (PFL) par l'aération et/ou par le pH peu élevé.

Stratégie 3 : L'inactivation de α -acétolactate décarboxylase (ALD) par la mutation ou l'ingénierie génétique.

Stratégie 4 : L'inactivation de diacétyle réductase (DR) par la mutation ou l'ingénierie génétique ou par l'inhibition d'acétoïne.

Stratégie 5 : La surproduction de α -acétolactate synthétase (ALS) par l'ingénierie génétique

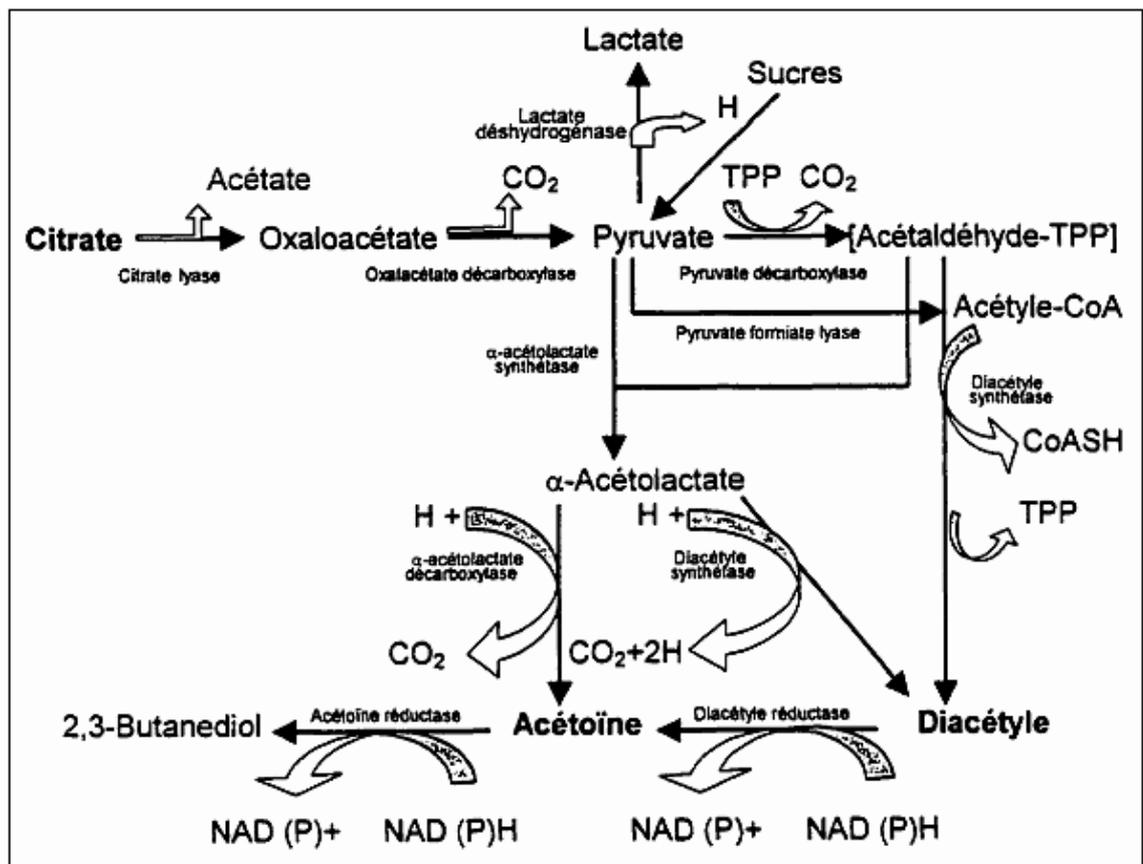


Figure 9. Voie métabolique du citrate des lactocoques et leuconostocs citrate positif (*Cit+*) (Jordan et al, 1996).

Les lactocoques et les leuconostocs produisent divers composés d'arômes tels : l' α -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle. L'acétoïne et 2,3- butanediol qui sont le résultat du métabolisme du citrate (Levata-Jovanovic et Sandine, 1997 cité par Baharak, 1999), Chez les bactéries lactiques, *Leuconostoc* et *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* se distinguent par leur métabolisme fermentaire du citrate (*Cit+*).

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, dans ces bactéries, le co-métabolisme du citrate et du

lactose entraîne la production de diacétyl, d'acétoïne et de CO₂ participant aux qualités aromatiques et texturales des produits (Raynaud, 2006). Le citrate perméase est essentiel au métabolisme du citrate.

V.2.2.2. La régulation des enzymes du métabolisme du citrate

« La production des composés aromatiques associés au métabolisme du citrate est un processus complexe qui dépend du taux d'utilisation du citrate, de la proportion de pyruvate produit et condensé pour la formation de l'α-acétolactate, du taux de transformation de ce dernier en diacétyl et acétoïne, ainsi que du taux de réduction de ces composés en 2,3-butanediol » (Cachon et Diviès, 1993). Les facteurs environnementaux et biologiques ayant une influence sur le métabolisme du citrate et la formation du diacétyl sont principalement le : pH, le citrate, l'oxygénation du milieu, les ions métalliques et le type de bactérie lactique.

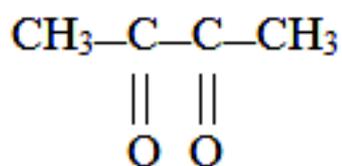
V.2.3. L'arome diacétyl : Description

Le diacétyl est l'élément dominant de l'arôme de beurre et de divers fromages (Rondags et al, 1998), il est identifié comme étant un des principaux composés d'arôme des laits et produits laitiers tels que les crèmes fermentées (le babeurre, la crème sûr), le yogourt (Lee et al, 1995), le fromage Cottage (Hugenholtz et Starrenburg, 1992) et les fromages frais (Boumerdassi et al, 1996).

V.2.3.1. Propriétés physicochimiques

Le diacétyl est une cétone liquide, il est également désigné sous le nom de biacétyl diméthylidécétone, dicétobutane, butanedione, diméthylglyoxal (Ott, 1999; Sergent, 1998).

Sa formule de constitution est la suivante :



Le diacétyl est un liquide huileux de coloration jaune très légèrement verdâtre, due à la présence des deux groupements carbonyle C=O en position α qui jouent le rôle de chromophores. Sous l'influence de l'excitation par la lumière de WOOD, les solutions de diacétyl, même diluées à 1 p. 1.000, présentent une belle fluorescence jaune verdâtre. Sa vapeur présente la couleur du chlore et possède une odeur désagréable prononcée, rappelant celle de la quinone (F.E.M.A, 2006).

Le diacétyl à l'état de traces se caractérise au contraire par une odeur agréable rappelant l'odeur de la crème fermentée ou du beurre frais (Oscar et al, 2001). Il bout sans décomposition. Il est un peu plus léger que l'eau. Il est soluble à la température ordinaire dans un peu moins de quatre fois son poids d'eau; il est miscible à l'alcool et à l'éther. Il est très soluble dans les corps gras (tableau 9).

Tableau 9. Propriétés physiques du diacétyl (F.E.M.A, 2006 Cité par Meziane, 2008)

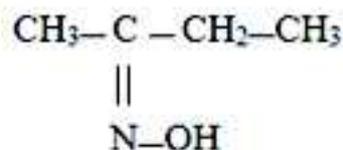
Propriétés	VALEURS
Masse molaire (g / mol)	86,09
Point de fusion (°C)	-2 à -4 sous 1 bar
Point d'ébullition (°C)	88 sous 1 bar
Densité (g / cm ³)	0,990 à 15 °C
Solubilité Eau	1:4

Le diacétyle s'oxyde facilement, notamment sous l'influence de l'eau oxygénée, pour donner de l'acide acétique

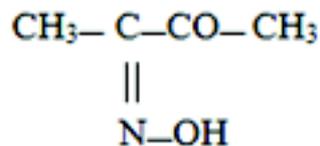
V.2.3.2. Procédés de fabrication du diacétyle

- Par voie chimique

Le diacétyle est obtenu à partir de l'homologue supérieur de l'acétone qui est la méthylacétone ou méthyléthylcétone de formule $\text{CH}_3\text{—CO—CH}_2\text{—CH}_3$ (Oscar et al, 2001). Cette dernière subit une nitrosation à l'aide du nitrite d'amyle pour bloquer d'abord le CO déjà existant, il se forme de ce fait un composé qui est la nitrosométhyléthylcétone (où le groupement cétonique est bloqué) de formule :



La transformation du CH_2 en CO débute par action de la soude sur La nitrosométhyléthylcétone, il se forme de l'iso nitroso méthyl éthyl cétone ou monoxime du diacétyle (le CH_2 se trouve remplacé par un CO) de formule :



Enfin, par ébullition avec l'acide sulfurique étendu, la monoxime libère le diacétyle par régénération du premier CO : $\text{CH}_3\text{—CO—CO—CH}_3$ (Oscar et al, 2001).

- Par voie biologique

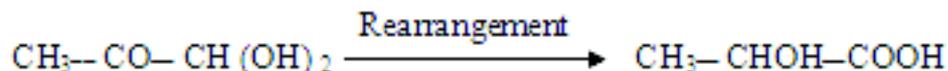
Selon Pack et al (1968), la synthèse de diacétyle par voie biologique débute par la transformation du lactose en deux molécules d'hexose sous l'influence de la lactase:



Puis, chaque molécule d'hexose est rompue en deux tronçons avec formation de méthylglyoxal sous sa forme hydratée :



La formation d'acide lactique se produit alors aisément par oxydoréduction intramoléculaire à partir du méthylglyoxal (Cachon et al, 2002) :

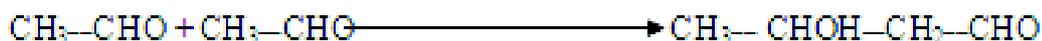


Cette réaction a pu, du reste, être obtenue dès 1913, in Vitro, par voie diastasique et constitue une véritable stabilisation du méthylglyoxal. Cette spécificité lactique réside dans le fait que les ferments lactiques, après avoir réalisé la formation du méthylglyoxal, sont incapables de désintégrer ce terme de passage autrement que par sa stabilisation à l'état d'acide lactique (Speckman et Collins, 1968). Cette incapacité caractérise les ferments lactiques purs. Mais à côté de ceux-ci, il en est d'autres qui sont capables d'agir sur le méthylglyoxal et qui par oxydation donnent naissance à de l'acide pyruvique:



Lequel peut être extrait, dans des conditions particulières, des produits de la fermentation des sucres.

Celui-ci perd facilement le CO₂ pour donner naissance à l'éthanal CH₃—CHO, qui peut se transformer, soit en alcool, soit en acide acétique ou en aldol. Cette dernière réaction, ou aldolisation, est particulièrement intéressante (Cachon et al, 2002)



Selon Tapernoux (1932), par simple isomérisation, l'aldol se transforme en acétoïne appelé autrement acétylméthylcarbinol :



Et ce dernier oxydé donne naissance au diacétyl :



Alors que par réduction, il donne au contraire le butylène-glycol :



V.2.3.3. Extraction et purification du diacétyl

De nombreuses techniques d'extraction reposent sur la volatilité des composés d'arôme. L'odeur et l'arôme résultent d'un subtil équilibre entre les divers composés volatils et les autres constituants d'une matrice (Chavanne et al, 1987).

L'extraction de ce composé comporte deux difficultés principales qui correspondent d'une part à la nécessité d'extraire intégralement tout le diacétyl, d'autre part à la nécessité de ne pas le perdre pendant cette extraction (Lee et Drucker, 1975).

L'extraction du diacétyl par la vapeur d'eau n'est pas à proprement parler un «entraînement », ce terme devant être réservé à l'extraction de substances à point d'ébullition élevé ou non miscibles à l'eau. Dans ce cas, la substance est plus volatile que l'eau (point d'ébullition du diacétyl : 88°) et soluble dans l'eau. Il s'agit de réaliser

une distillation fractionnée exactement comme dans le cas de solutions d'alcool dans l'eau (Chavanne et al, 1987).

La véritable solution de la rectification est fournie par des appareils du type « colonnes à plateaux ». Une condensation partielle de la vapeur se fait dans ces derniers; une grande partie de cette vapeur se rend directement au réfrigérant et son enrichissement en substance volatile est faible (Lee et Drucker, 1975).

Dans les colonnes du type « à plateaux », le trajet des vapeurs est ménagé par un barbotage dans de l'eau condensée chaude. Toute la vapeur doit entrer en contact avec ce liquide. Il en résulte d'une part une « condensation provoquée » plus importante et, d'autre part, un retard au départ de la substance volatile qui, au lieu de rester très diluée dans la vapeur, se concentre dans l'eau condensée. Le liquide ainsi formé s'enrichit sans cesse et cède au réfrigérant une vapeur riche qui fournit un distillat à haut titre (Chavanne et al, 1987).

V.2.4. Facteurs affectant la production du diacétyle et l'acétoïne

Les facteurs environnementaux et biologiques ayant une influence sur le métabolisme du citrate et la formation du diacétyle sont principalement le : pH, le citrate, l'oxygénation du milieu, les ions métalliques et le type de bactérie lactique.

V.2.4.1. Effet du pH

Le pH du lait se situe entre 6,6 et 6,8. Il est une propriété physico chimique importante du lait - qui influence la fermentation lactique (Desmazeaud, 1994). Selon Cachon et Diviès (1994), l'effet du pH sur la fermentation de l'acide citrique provient d'un taux maximal de l'utilisation du citrate dans la bioconversion et la réduction continue du diacétyle et de l'acétoïne. Ainsi d'après ces auteurs, la production des composés d'arômes est un phénomène complexe qui résulte de l'interaction du pH, de la concentration de l'acide citrique.

V.2.4.2. Effet de la température

Le niveau des composés diacétyle et d'acétoïne dans la culture du lait dépend de temps de culture et de la phase de croissance de la souche. Selon Oberman et Temps al (1982) les souches de *Leuconostoc* produisent un niveau maximal de diacétyle après 24 h de culture. Tandis que, les souches de *Lc. diacetylactis* produisent un niveau maximal de diacétyle après 6 h de culture.

Schmitt et al (1988) ont conclu que certaines conditions de culture, telles qu'une température de 22°C, et un pH de 4,8 augmentent la production des composés en C₄ (diacétyle, acétoïne et 2,3-butylène glycol), les composés en C₂ (acétaldéhyde, éthanol et acétate) ainsi que le formiate. D'après Sellars et Babel (1970) cité dans Champagne et al (1992) la production de diacétyle s'effectue lorsque le pH est inférieur à 5,2.

V.2.4.3. Effets du citrate

La présence du citrate est nécessaire à la formation des molécules aromatiques en C₄ : diacétyle, acétoïne et 2,3-butanediol (Cachon et Diviès, 1993). Plusieurs auteurs ont également rapporté que la croissance de *Leuconostoc* et *Lc. lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis* dans un milieu contenant des glucides fermentescibles pourrait être bonifiée par la présence de citrate, l'ampleur de la stimulation variant selon les espèces et les conditions de croissance (Garcia-Quintans et al, 1998)

L'étude de Bassit et al (1993) démontre clairement que la production de diacétyle et d'acétoïne par toutes les souches de *Lc. lactis* s'améliore quand la concentration initiale de l'oxygène augmente. La production de l' α -acétolactate, du diacétyle et de l'acétoïne avait atteint leur niveau maximum quand 10 mmol/L de citrate a été ajouté (Jordan et Cogan, 1995).

Ces auteurs ont démontré que la concentration maximale en diacétyle et le rapport diacétyle / acétoïne sont maximums à une température de 18°C et ce en présence de 100% d'oxygène.

V.2.4.4. Effet des ions métalliques

Les études de Harvey et Collins (1961) ont démontré que l'activité de la citrate lyase (citritase) nécessitait la présence de cations Mg^{2+} , ou Mn^{2+} . Dans une publication ultérieure, ces auteurs ont démontré que le taux de réaction de cette enzyme dépendait de la concentration du complexe formé par le citrate et les cations, établissant ainsi que ce complexe était le substrat de l'enzyme, et non le citrate libre (Harvey et Collins, 1963).

Kaneko et al (1987), ont rapporté au cours de leur étude portant sur l'effet des ions métalliques sur la production de diacétyle, que la production de ce composé était bonifiée par l'addition de Cu^{2+} et que celui-ci avait un effet stimulant sur l'activité de la citrate lyase.

V.2.4.5. Effet de l'activité de l'eau

Bassit et al (1993) ont remarqué qu'à la phase de croissance exponentielle de *Lc. diacetylactis*, un taux élevé de l' a_w ($a_w > 0,95$) est caractérisé par une consommation marquée de lactose et des acides aminés. Cependant, une fois que la croissance est arrêtée, la production de l'acide lactique continue et les acides aminés se libèrent d'une manière prononcée.

V.2.4.6. Le genre bactérien

La plupart des leuconostocs ont une faible activité de production des composés d'arôme en comparaison avec le *Lc. diacetylactis*, qui peut accumuler de 1 à 10 mg de diacétyle par litre et de 230 à 500 mg /L d'acétoïne (Drinan et al, 1976). Cependant, le *Lc. diacetylactis* semble être la bactérie lactique la plus active, parmi les lactocoques qui contiennent l'enzyme diacétyle réductase, dans la réduction de diacétyle (Walsh et Cogan, 1973).

V.2.5. Différentes utilisations du diacétyle

V.2.5.1. L'emploi du diacétyle comme améliorant de la qualité organoleptique

Les bactéries lactiques contribuent à développer les qualités organoleptiques par la formation d'acide lactique, d'acétoïne, d'acétaldéhyde, diacétyle, de peptides et d'acides aminés, qui sont des précurseurs d'arômes, lesquels se développent lors des étapes ultérieures des procédés de fabrication des produits fermentés (Gasson et al, 1996).

Le diacétyle (2,3-butanedione) est un important aromate, de nature oxydative, il joue un rôle prédominant dans la saveur des produits laitiers et fromages frais notamment de type cheddar (Bassit et al, 1994).

V.2.5.2. L'emploi du diacétyle comme conservateur

La bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments (Rodgers, 2001). Les aliments fermentés sont un bon exemple de produits faisant appel à la bio-préservation.

En effet, le diacétyle est une substance antimicrobienne dont les propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens (Yang, 2000).

En général, le diacétyle présent dans la majorité des produits laitiers est issu de la fermentation de l'acide citrique (Jordan et al, 1996). Il peut aussi être la conséquence d'une contamination des produits laitiers par des levures qui le produisent (Collins, 1972) et de bactéries telle que le *Pseudomonas* (Antinone et al, 1994), ou par l'ajout direct de diacétyle au produit. *Lc. diacetylactis* et *Ln. cremoris* en métabolisant le citrate, produisent des composés d'arômes tels que le diacétyle et le CO₂ (Marshall, 1993).

La production de ces substances d'arôme s'effectue lorsque le pH est inférieur à 5,2 (Champagne et al, 1992). Dans la fermentation du citrate et du lactose le pyruvate est l'intermédiaire essentiel.

Dans ces deux procédés, *Lc. diacetylactis* de façon homo-fermentaire convertie le pyruvate en lactate à des taux de croissance élevés, à bas pH et à des concentrations de lactose élevées (Starrenburg et Hugenholtz, 1991).

L'usage du citrate par certaines bactéries lactiques joue un rôle important dans la production d'un grand nombre de produits laitiers fermentés. L'utilisation de l'acide citrique aboutit à la production de dioxyde de carbone (CO₂) et de diacétyle. Le diacétyle est donc essentiel pour la saveur des produits laitiers tels le beurre de culture, le babeurre et certains fromages frais.

Le CO₂ produit pendant le métabolisme du citrate, est responsable de l'existence des trous dans certains types de fromage (Gouda et Edam).

Plusieurs bactéries lactiques, spécialement *Lc. diacetylactis*, utilisent le citrate pour produire les composés d'arôme tel que le diacétyle et l'acétoïne (Hugenholtz et al, 1993). Un petit nombre d'espèces de bactéries lactiques est capable de métaboliser le citrate (Starrenburg et Hugenholtz, 1991). Ces auteurs démontrent également que la croissance de *Ln. cremoris* en présence du lactose est stimulée par le citrate, en présence de citrate seul, aucune croissance n'est observée.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel

I.1. Source d'isolement

Les souches de bactéries lactiques mésophiles (lactocoques leuconostocs et lactobacilles) ont été isolées à partir du lait de vache, provenant :

- De la ferme ITELV de (Baba-Ali), Alger.
- D'une petite ferme (élevage familial de vaches) d'un particulier, située dans la commune de (saoula) Alger.
- d'une ferme d'élevage de la région de Bordj-Menaïel (wilaya de Boumerdès).

I.2. Milieu de culture

I.2.1. Milieux d'isolement et de purification

Les genres étudiés sont mis en évidence sur leurs milieux.

- **Milieu M17** (gélose et bouillon) préconisé par Terzani et Sandine (1975) est employé pour la recherche des lactocoques. L'ensemencement est réalisé en surface (Amrouche, 2003).

- **Milieu MRS** (gélose et bouillon) (Man Rogosa et Sharpe) est le plus connu pour la recherche et l'isolement des lactobacilles (composition en annexe). L'ensemencement est effectué en surface (Leveau et al, 1991).

- **Milieu Mayeux** sert pour l'isolement des Leuconostocs. L'ensemencement de l'inoculum se fait en surface (Leveau et al, 1991).

Trois boîtes de Pétri par dilution de (10^{-3} à 10^{-5}) et par échantillons sont ensemencées et incubées à 30 °C durant 48 h. Le nombre de colonies par souches est évalué en UFC (unité formant colonie) par millilitre d'échantillon de lait analysé. Toutes les souches isolées sont conservées et entretenues dans leurs milieux.

I.2.2. Milieux de caractérisation phénotypique et technologique

- Lait écrémé.
- Milieux de la galerie biochimique.
- Milieux de caractérisation technologique.

I.2.3. Milieux de conservation

Les milieux utilisés sont :

- **Gélose M17 et MRS** et **milieu Mayeux** (selon la souche), pour une conservation à courte durée (10 à 15 j).

- **Milieu LTSG** pour une conservation à longue durée (plusieurs mois).

I.2.4. Réactifs chimiques

- Alcool.
- Eau oxygénée.
- Eau peptonée.
- Fuschine de Ziehl
- Indicateurs de pH.
- Bleu de méthylène ;
- Lugol.
- NaCl.
- NaOH.
- Bouillon lactose citraté
- Réactif de Nessler.
- Sucres.
- Teinte de tournesol.
- Tellurite de potassium.
- Violet de Gentiane.
- VP I et II.

I.2.5. Solution physiologique de NaCl

Cette solution physiologique est utilisée comme diluant dans la préparation des différentes dilutions décimales (9g de NaCl/l d'eau distillée).

II. Méthodes

II.1. Prélèvement du lait

Le lait de vache cru a été traité avec un grand soin, afin d'éviter toute contamination qui peut influencer la flore lactique. Pour cette raison, les mains du vacher et les mamelons sont désinfectés avec de l'eau javellisée.

Le lait de vache est recueilli dans des flacons de 250 ml stériles placés tout près du mamelon, ensuite les échantillons sont soigneusement étiquetés (lieu, commune, date...) et soumis à une réfrigération immédiate à 4°C, jusqu'au moment de leurs analyses.

II.2. Echantillonnage

Les échantillons étudiés qui ont servi pour l'isolement sont au nombre de trois, il s'agit du :

- Lait de vache cru, collecté de la ferme de baba Ali, et de saoula.
- Lait caillé (c'est du lait de vache laissé coaguler à température ambiante durant
- Leben artisanal (ou petit-lait), issu du lait de vache (provenant d'une ferme pilote à Boumerdès).

La préparation de ce petit lait est très simple : le lait est laissé à lui-même dans une jarre en terre cuite jusqu'à sa coagulation. Après 44 h à 20-22° C, le lait coagulé est transvasé dans une jarre pour subir l'opération de barattage et le rajout d'un volume d'eau équivalent à 10% du volume de lait traité, favorise le rassemblement des grains de beurre qui seront recueilli avec une louche métallique flambée à l'alcool.

II.3. Techniques d'isolement et de purification des souches lactiques

II.3.1. Préparation des échantillons (Dilutions décimales)

- Agiter pendant 10 secondes le flacon contenant le lait à diluer.
 - Prélever 1 ml de lait à l'aide d'une pipette graduée stérile.
 - Introduire aseptiquement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique.
 - Agiter puis transférer 1 ml de ce premier tube dans le deuxième.

De la même façon, des dilutions décimales successives sont effectuées (jusqu'à 10^{-5}).

II.3.2. Isolement

Les techniques d'isolement sont basées sur l'obtention d'un clone, c'est-à dire d'une culture issue d'une seule cellule. Les méthodes utilisées sont basées sur les dilutions et les étalements. Elles ont l'avantage de coupler isolement et comptage de la flore et de permettre la réalisation de prélèvement de colonies pour l'identification (Guiraud, 1998).

L'isolement est effectué le jour même de la réception des échantillons. Les boites de Pétri sont inoculées (ensemencement en masse) à partir des trois dernières dilutions (10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}), puis incubées à 30°C pendant 48 heures.

La solution mère a été préparée en prélevant 1 ml de chaque échantillon (de lait de vache cru, de Leben), et 1 g (du lait caillé), qui a été ajouté à l'eau physiologique stérile. A partir de cette solution mère, des séries de dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-7} ont été effectuées pour les échantillons cités. Et les genres de lactocoques et leuconostocs (qui représentent les genres qui intéressent surtout notre étude, sont mis en évidence sur leur milieu déjà cités auparavant au point 4,2.

II.3.3. Description du stade d'incubation

L'ensemble des boites de petri inoculées a été incubé en anaérobiose dans des jarres à 30°C pendant 72 heures. Après incubation, des dilutions décimales successives ont été réalisées dans de l'eau peptonée stérile (9mL) jusqu'à une dilution de l'ordre de 10^{-6} .

100 µL égal à (0,1 ml) ont été prélevés à partir de chaque dilution et ensemencés en surface de boîtes de pétri contenant du milieu MRS Agar modifié (10 g.l^{-1} d'acétate de

sodium). Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 à 72 heures. Après incubation, 10% des différents types de colonies formées ont été sélectionnés puis purifiés sur du MRS Agar et des tests complémentaires notamment le test de catalase et la coloration de Gram ont été réalisés.

(Voir composition des milieux en annexes).

Les colonies ont été comptées pour le lait cru, Leben, et lait caillé en utilisant la formule suivante :

UFC /ml = nombre de colonies x 1/Ve x 1/D

D : la dilution prise en compte.

Ve : le volume d'ensemencement.

II.3.4. Purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon spécifique (selon la souche) jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries (Guiraud ,1998).

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram avec, une recherche de la catalase après chaque repiquage (annexe). Seuls les bactéries à Gram positif (+) et catalase négatif (-) sont retenues.

Des caractères structuraux peuvent éventuellement être mis en évidence par le biais de la coloration de Gram qui est effectuée sur frottis. Cette dernière permet une distinction des bactéries en deux grands groupes, en fonction des colorations finales des cellules. Les bactéries à Gram positif sont de coloration violette et celles à Gram négatif sont de coloration rose. Ces différences sont dues aux structures de la paroi bactérienne (Guiraud, 1998). Les figures (10, 11 et 12) illustrent la démarche de l'isolement et la purification des Lactocoques, des Leuconostocs et Lactobacilles.

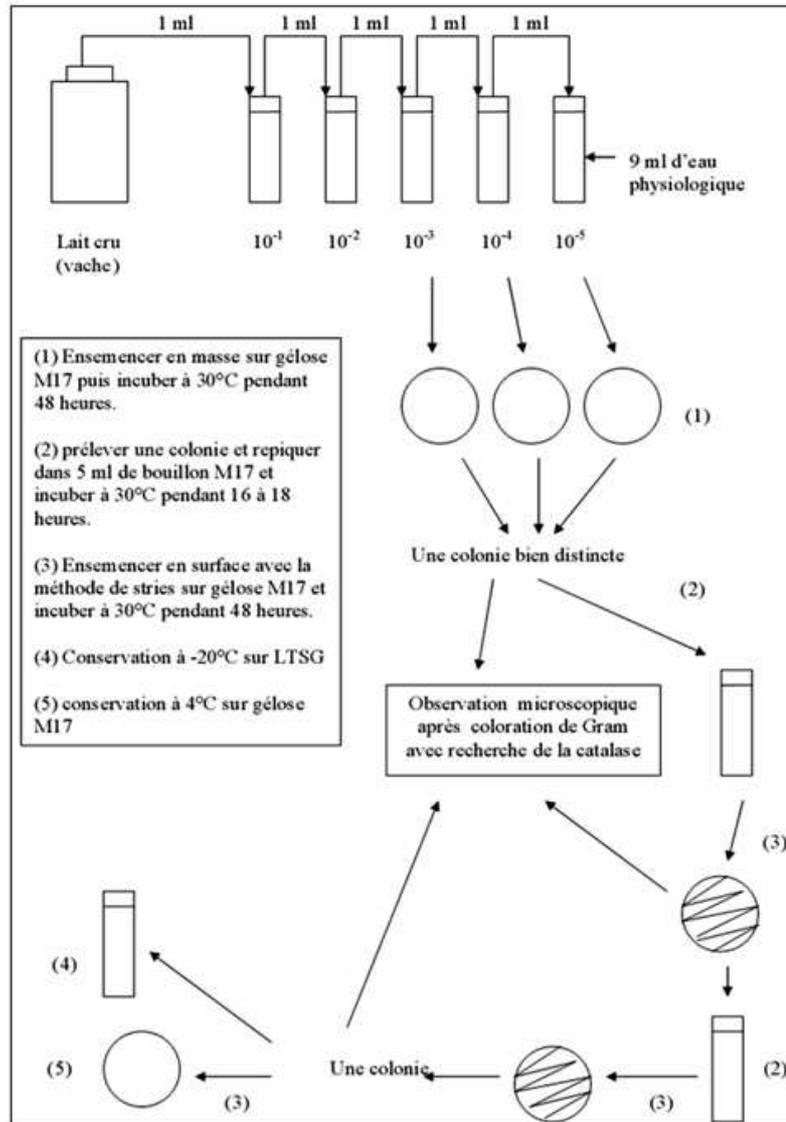


Figure 10. Isolement et purification des lactocoques

(De Roissart, 1986).

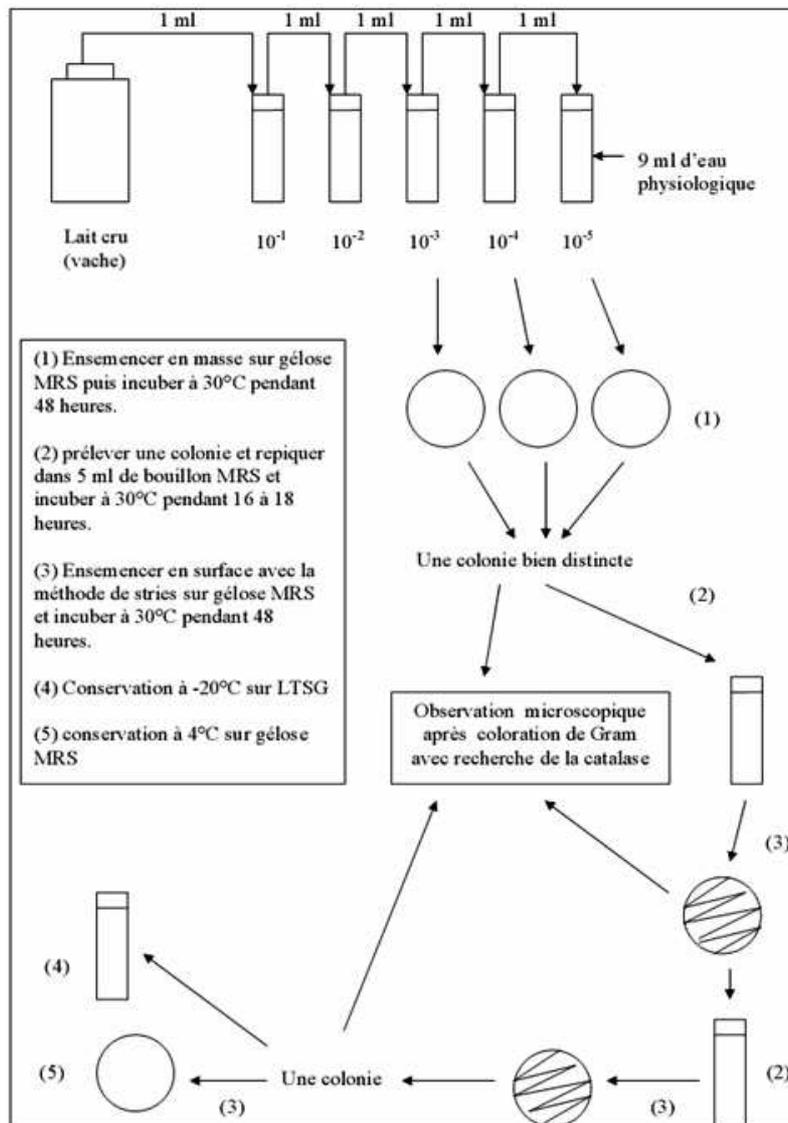


Figure 11. Isolement et purification des lactocobacilles (Cherprenet et Cau, 1982).

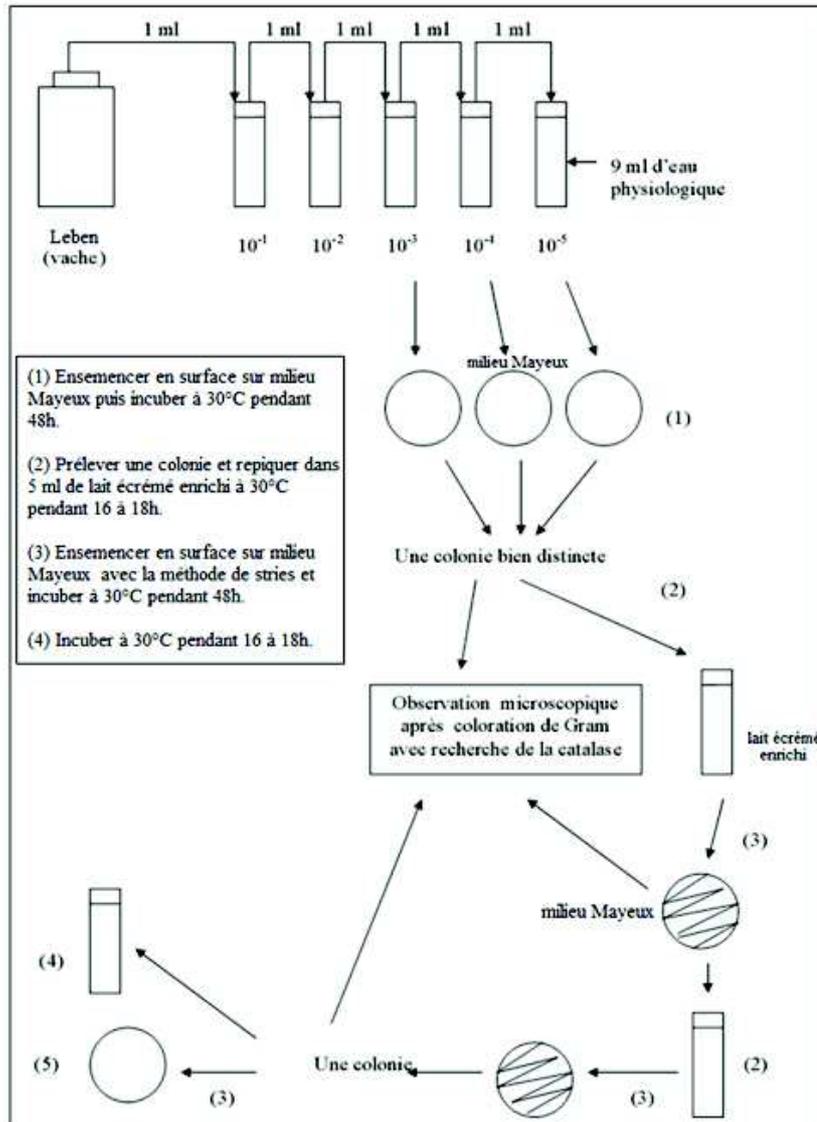


Figure 12. Isolement et purification des *Leuconostocs*

(Cherprenet et Cau, 1982).

II.3.5. Conservation des souches

En attendant d'être identifiées et étudiées, les souches isolées et purifiées sont conservées en plusieurs exemplaires dans du lait écrémé avec 10% de glycérol au congélateur à une température de -20°C. Les principales étapes d'isolement et de purification des bactéries lactiques sur le lait de vache sous ses deux formes (cru et caillé), leben artisanal et ferment lyophilisé sont illustrées dans les tableaux (10, 11 et 12).

Tableau 10. Isolement et purification des lactobacilles thermophiles et mésophiles

Isolément et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle)

Différentes étapes	Modes opératoires
1	1ml de lben ou de ferment lyophilisé ont été prélevés et dilués dans de l'eau physiologique stérile.
2	Les premières dilutions (-1, -2,-3) ont étéensemencées en doubles couches et en profondeur sur boîte de pétri.
3	Les boîtes de pétriensemencées ont été mises à l'intérieur d'une jarred'anaérobiose et incubées à 45°C/72h pour les lactobacilles thermophiles et à 30°C pour les lactobacilles mésophiles.
4	Les boîtes ayant des colonies bien développées, bien séparées et non contaminées par les levures et les moisissures ont été retenues.
5	Après avoir effectué une coloration de gram pour les colonies bien distinctes pour s'assurer de la coloration et la forme des cellules, une colonie a été prélevée etensemencée dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/v) et incubé à 45°C/24h pour les lactobacilles thermophiles et à 30°C/24h pour les lactobacilles mésophiles.
6	Plusieurs repiquages (généralement 3) successifs ont été faits jusqu'à l'obtention d'une souche pure suivie par une observation microscopique qui révèle une homogénéité des formes.
7	Plusieurs colonies ont été prélevées et conservées dans du lait écrémé et mises par la suite au congélateur (-20°C) en attendant leur identification.

Tableau 11. Isolément et purification des streptocoques thermophiles et Lactocoques (Streptocoques mésophiles).

Différentes étapes	Modes opératoires
1	1ml de lait cru ou de ferment lyophilisé ont été prélevés et dilués dans de l'eau physiologique stérile.
2	Les dernières dilutions (-3, -4,-5) ont étéensemencées en profondeur puis incubées à 42°C/48h pour les Streptocoques thermophiles et à 30°C/48h pour les Lactocoques.
3	Les boîtes de pétri ayant des colonies bien distinctes ont été retenues, une coloration de Gram a été effectuée pour observer la forme des cellules et leur coloration.
4	Une colonie bien distincte a été prélevée aseptiquement et mise dans du lait écrémé stérile reconstitué à 10% (p/v) et incubé à 42°C/24h pour les Streptocoques thermophiles et à 30°C/24h pour les Lactocoques.
5	Plusieurs repiquages ont été faits jusqu'à s'assurer de la pureté totale de la souche, confirmée par des observations microscopiques effectuées après chaque repiquage.
6	Les souches pures ont été conservées dans du lait écrémé stérile et mises au congélateur à -20°C en attendant leur identification.

Tableau 12. Isolément et purification des Leuconostocs.

Différentes étapes	Modes opératoires
1	1ml de lben a été prélevé et dilué dans de l'eau physiologique stérile.
2	Les dernières dilutions (-3, -4,-5) ont été ensemencées en surface puis incubées à 30°C/3 à 4 jours.
3	Les boîtes de pétri ayant des colonies bien distinctes non contaminées, ont été retenues une coloration de Gram a été effectuée.
4	Une colonie a été par la suite prélevée aseptiquement et mise dans du lait écrémé stérile enrichi à 0,3% d'extrait de levures reconstitué à 10% (p/v) et incubé à 30°C/24h.
5	Des colorations de Gram ont été effectuées après chaque repiquage afin de s'assurer de la pureté de la souche.
6	En attendant d'être identifiées les souches isolées et purifiées sont conservées au congélateur à une température de -20°C.

II.3.5.1. Repiquages successifs

Cette méthode est utilisée pour une conservation des souches à courte durée. Les souches pures sont cultivées sur gélose appropriée et conservées à 4°C. La vitalité des souches se maintient pendant des durées variables (selon la souche). Au bout de ce délai, un nouveau repiquage est réalisé.

II.3.5.2. Congélation

Elle est employée pour une conservation des souches de un à plusieurs mois. Elle s'effectue en congelant des cultures jeunes, non incubées ensemencées massivement sur milieu LTSG (dont le glycérol joue le rôle d'un cryoprotecteur (Champagne et al, 2000).

Les caractéristiques générales qui permettent de différencier les souches de bactéries lactiques sont ceux préconisés par Bernnan et al (2001) cité par Bekhouche (2006).

II.4. Identification des souches isolées

II.4.1. Etude des caractères culturaux

Ce test consiste à une observation directe (à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire) des colonies obtenues sur milieux gélosés MRS et M17. Il permet de renseigner sur la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'odeur, le contour et la couleur des colonies étudiées.

II.4.2. Etude des caractères morphologiques

Cette étude s'effectue par examen microscopique. Elle permet d'observer la morphologie des cellules : leur taille, leur mode de regroupement et leurs caractères structuraux. L'étude morphologique des bactéries nécessite la préparation d'un frottis coloré.

- Frottis

Le frottis consiste en un étalement de la substance à étudier sur une lame propre, suivi d'un séchage, d'une fixation et éventuellement d'une coloration.

- Coloration

La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes Gram + et Gram - .

Le test coloration de Gram : a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame. Des solutions de cristal violet et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis pendant 1 min, suivi d'un lavage à l'eau. De l'éthanol à 90% a été appliqué sur le frottis, qui ensuite a été traité avec de la fuschine pendant 30 secondes. Le frottis a été observé au microscope (Olympus, Japon) sous immersion au grossissement 1000 X. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (-).

II.4.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

- L'activité catalytique : Test de la catalase

Pour la mise en évidence de cette enzyme, on prélève une colonie jeune développée sur un milieu gélosé, et on la dépose sur une lame contenant deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. On réalise alors une suspension en étalant soigneusement la préparation bactérienne.

La présence de catalase se traduit par l'apparition d'une effervescence. Les isolats ne possédant pas de catalase sont incapables de dégrader le peroxyde d'hydrogène; ils sont catalase négatifs caractéristique des bactéries lactiques.

- L'activité citratase

Elle est mise en évidence par culture sur gélose semi-solide au lait citraté. La gélose estensemencée dans la masse et incubée à 30°C pendant 2 à 7 jours. . Cette activité enzymatique est recherchée chez les souches des genres Streptococcus, Lactococcus et Enterococcus.

La fermentation se traduit par la production de bulles de gaz dans la masse gélosée.

- Température de croissance

Le développement des souches aux températures optimales est réalisé à :

- **10° et 45 °C**, les souches sont cultivées sur le milieu de Naylor et Sharpe pour les genres Lactococcus et sur le milieu M.R.S pour le genre Lactobacillus.
- **37° et 45 °C**, les cultures sont réalisées sur le milieu Naylor et Sharpe pour le genre Pediococcus et seulement.
- **37 °C** sur le milieu de Mayeux pour les Leuconostoc.

- Croissance dans les conditions hostiles

Différents milieux hostiles peuvent être testés. Pour les tests suivants : croissance en présence de NaCl, la culture à différents pH et la thermorésistance, les milieux utilisés sont:

- MRS bouillon pour les lactobacilles.
- M17 bouillon pour les lactocoques.
- Milieu Mayeux pour les L actocoques.

La croissance des souches dans des conditions hostiles est étudiée sur le milieu de Naylor et Sharpe à :

- **pH 9,6** pour les genres Streptococcus, Lactococcus et Enterococcus, le pH 9,6 est obtenu par l'addition d'une solution de NaOH (1N).

- **pH 5** pour le genre *Pediococcus*, le pH initial du milieu de culture égal à 7 est abaissé jusqu'à 5 avec une solution d'acide lactique (1N).

- Croissance en présence de NaCl

Les milieux additionnés de 2%, 4% et 6,5% de NaCl sont ensemencés, puis incubés à 30°C pendant 2 à 3 jours. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

- Thermorésistance

La thermorésistance est mise en évidence par chauffage du milieu au bain marie. Deux tests sont réalisés : l'un à 60°C pendant 90 minutes, l'autre à 65°C pendant 30 minutes.

Il faut prendre garde de ne pas souiller les bords des tubes en inoculant et de refroidir rapidement les tubes après chauffage.

Après refroidissement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 heures. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

- Croissance sur lait bleu de Sherman

Le bleu de méthylène est décoloré par les germes possédant une activité réductasique : cette propriété est utilisée pour estimer la charge microbienne du lait, mais également pour caractériser les espèces.

Du lait à 1% de bleu de méthylène est ensemencé et incubé durant une période de 24 à 48 heures à 30°C.

- Culture sur lait tournesolé

Le tournesol est un indicateur de potentiel redox et de pH. Le lait tournesolé est ensemencé avec une culture pure de l'organisme à tester.

L'action sur le milieu est suivie en fonction du temps.

- Un virage du mauve au rose indique une acidification due à l'attaque du lactose.
- une décoloration de l'indicateur traduit une réduction.
- Une coagulation du lait (activité protéolytique).
- Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est détectée par la réaction de Voges Proskauer sur le bouillon lactosé et citaté. Elle concerne les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

L'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer après une culture de 3 à 7 jours à 30°C sur bouillon lactosé citaté (Institut Pasteur).

1 ml de culture est additionné de 0,5 ml de réactif à l' α -naphthol et 1 ml de NaOH à 16 %. Après agitation durant 10 min une coloration rose indique la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude et se combine avec l' α -naphthol en complexe rouge.

- Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de cet hétéroside est mise en évidence sur le milieu gélosé à l'esculine (Institut Pasteur). Après une incubation à 30°C pendant 2 à 3 jours, elle se traduit par un noircissement du milieu.

- Désamination de l'arginine

Elle est recherchée sur bouillon (MRS ou M17 selon la souche) à 0,3% d'arginine. Après 2 à 6 jours d'incubation à 30°C, la formation d'ammoniac est mise en évidence par adjonction d'une goutte de réactif de Nessler à une goutte de culture sur une lame : il se développe une coloration rouge orange.

- Fermentation des sucres

Elle est réalisée dans les milieux de cultures spécifiques aux genres.

Après 3 à 7 jours d'incubation à 30 °C, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre. Pour les souches *Lactococcus*, les sucres testés sont: le lactose, le maltose et le mannitol.

Pour les souches du genre *Leuconostoc*, les sucres sont: le saccharose et le fructose. La dégradation des sucres par les souches du genre *Lactobacillus* est mise en évidence avec le lactose, le melibiose, le saccharose et le raffinose.

Il est recommandé d'effectuer un témoin sans sucre ensemencé par les souches qui ne doit pas présenter de virage de l'indicateur.

II.5. Méthodes physiques et chimiques

II.5.1. Pouvoir acidifiant

L'étude des aptitudes technologiques constitue un bon critère de sélection des différentes souches identifiées. Selon Champagne et Moineau (2003) plusieurs tests peuvent être réalisés. L'acidité est une notion très importante pour l'industrie, car elle permet de juger l'état de conservation du lait, elle est quantifiée par la mesure du pH ou par titration (acidité Dornic) (Boudrier, 1985).

- **Le pH** : est déterminé en utilisant un pH mètre.
- **L'acidité** : est effectuée en titrant 20 ml de l'échantillon par une solution de soude NaOH N/9, la phénolphthaléine (à 1%) a été utilisée comme indicateur.

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique.

1°D = 0,1 g d'acide lactique /litre de lait (Accolas et al, 1977 ; Lucas et Reyrolle, 1989).

Afin de préparer une préculture, les souches isolées sont décongelées, repiquées deux fois à 24heures d'intervalle sur du lait écrémé stérile reconstitué à 10% (p/v).

Par la suite, un flacon contenant 100 ml de lait écrémé stérile reconstitué à 10% (p/v), enrichi à 0,3% (p/v) en extrait de levures pour les *Leuconostocs*, est ensemencé à partir de cette préculture à un taux de 1% préconisé par (Accolas et al, 1977 ; Chamba et Prost, 1989), puis réparti dans 10 tubes stériles à raison de 10 ml par tube que nous incubons aux températures rapportées dans les tableaux 10, 11 et 12 . Par la suite, on mesure le pH, et l'acidité selon la méthode suivante :

- On prélève 10 ml de lait préalablement mélangé avec soin.
- On ajoute 1 à 2 gouttes de phénol phtaléine (solution à 1% dans l'alcool éthylique à 95°C).
- Et on neutralise par addition de soude N/9 jusqu'à coloration rose très pale.
 - L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°D).

La courbe d'acidification en fonction du temps peut alors être tracée.

II.5.2. Pouvoir aromatique et acceptabilité organoleptique

II.5.2.1. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle, par dégustation de caillé modèle, permet d'obtenir une information globale de l'arôme produit par la souche. Des défauts de texture et de goût peuvent aussi être évalués. Etant donné la diversité des substances aromatiques produites par les bactéries lactiques, nous avons opté pour le dosage du composant le plus important « l'arôme de diacétyle ».

II.5.2.2. Dosage du diacétyle

La quantification du diacétyle est réalisée par la méthode colorimétrique de Walsh et Cogan (1974) préconisée par Bassit et al (1974). Cette méthode est fondée sur le fait que le diacétyle est transformé en diméthyle glyoxime en présence d'hydroxylamine, et en diméthyle glyoximate amino-ferreux rose, celui-ci est complexé par le sulfate de fer en solution alcaline.

L'absorbance de la coloration rose est mesurée par un spectrophotomètre (Perkin-Elmer) à 530 nm (Walsh et Cogan, 1974).

La concentration en diacétyle est obtenue à partir de courbe étalon déterminé après distillation de l'échantillon lait, (lait caillé dans notre étude), ce dernier contient trois niveaux de diacétyle. Trois essais sont réalisés et la courbe de régression est obtenue à partir de la moyenne des 3 essais effectués.

Après ensemencement, la culture est répartie dans huit (8) tubes à essais stériles à raison de 20 ml par tube. Ces derniers sont incubés à 21°C pendant 24 heures durant lesquelles la production de diacétyle est déterminée. Après distillation de 20ml de la culture à l'aide d'un rota-vapeur (Buchi) réglé à 80°C, seuls les dix (10) premiers millilitres sont recueillis.

1,5 ml d'hydroxylamine sont ajoutés à 5ml de distillat. Le mélange est chauffé jusqu'à 75°C pendant 20 minutes dans un bain marie. Lorsque celui-ci est encore tiède 0,5 ml d'acétone phosphate sont ajoutés, mélangés et refroidis à température ambiante ; 1,5 ml de solution alcaline de tartrate de sodium et de potassium sont ajoutés, suivis immédiatement de 0,1ml de FeSO₄. Après un mélange vigoureux, le volume est ajusté à 10 ml avec du à K₂HPO₄ à 33%. La lecture est effectuée après 15 minutes.

II.5.2.3. Recherche des souches aromatisantes

Les souches aromatisantes, sont des souches qui fermentent les citrates pour donner du diacétyle. Elles possèdent des enzymes qui en fermentant le citrate contenu dans le milieu KCA apparaissent sous forme de colonies formant une zone d'éclaircissement autour d'elles.

II.5.2.4. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée de façon rapide par l'examen du lait tournesolé. Après incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours, ce milieu permet d'observer plusieurs types de réactions : attaque de lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au

rouge) ; attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu) ; peptonisation de la caséine après ou en dehors de toute coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulas).

II.5.2.5. Activité lipasique

L'activité lipasique peut être recherchée sur un milieu gélosé au Tween 80 (Institut Pasteur). Ce milieu est coulé en boîte de Pétri et ensemencé par touches. Après incubation, l'activité lipasique se traduit par un halo opaque autour des colonies, halo dû à la précipitation d'oléate de calcium.

II.5.3. Dénombrement des cellules bactériennes

Afin d'étudier les aptitudes technologiques des cultures mixtes, il est nécessaire de calculer la moyenne des dénombrements des colonies sur plusieurs boîtes de pétri, ainsi on obtient une estimation de la concentration cellulaire exacte de l'inoculum. Après dénombrement des colonies qui se sont développées sur les boîtes de pétri, il restera qu'à déduire le taux d'ensemencement selon les rapports suivant : *Leuconostoc* / *Streptocoque* : **L/S** = (1/1 ; 1/2 ; 2/1) (Hassan et al, 1989).

III. Composition et types de levains lactiques utilisés dans le caillé modèle

Dans notre étude, le levain que nous avons préparé et utilisé dans la fabrication du caillé, est fait à partir de souches mésophiles acidifiantes et aromatisantes.

III.1. Types de levains

Il existe trois types de levains lactiques qui sont utilisés, à savoir les levains mixtes, les cultures pures et les levains multiples.

De nombreux levains mixtes sont composés de deux types de bactéries, l'un étant responsable de la production d'acide et l'autre de la production d'arôme. Les bactéries acidifiantes prédominantes sont généralement des souches de *S. cremoris*, parfois de *S. lactis*, tandis que les bactéries aromatiques sont des leuconostocs ou *S. lactis subsp. diacetylactis*. Cette dernière espèce exerce une double fonction puisqu'elle produit aussi de grandes quantités d'acide. On subdivise les levains mixtes en quatre groupes selon la nature des bactéries d'arôme qu'ils contiennent.

III.2. Composition des levains

- Les levains du type B contiennent des leuconostocs producteurs d'arôme, tels que *Leuc. cremoris* (*Leuc. citrovorum*), *Leuc. Dextransicum* et (ou) *Leuc. lactis*.

- Les levains du type D contiennent *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteur d'arôme.

- Les levains du type BD contiennent à la fois des leuconostocs et *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme.
- Les levains du type N ne contiennent pas de bactéries aromatiques.

III.3. Entretien des souches

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les souches sont entretenues par repiquages dans les milieux de culture ; lait écrémé stérile pour streptocoques lactiques ; bouillon MRS pour lactobacilles.

Le lait écrémé reconstitué (à raison de 100 g pour 1 litre d'eau distillée) est réparti dans des flacons de 150 à 250 ml par flacon, qui seront portés à l'autoclave 15 min à 120°C.

100 ml de lait écrémé ensemencé à raison de 2% que nous incubons aux températures fixées, pendant 24 heures, durant lesquelles les titrages d'acidité sont effectués.

III.4 Fabrication d'un caillé : Modèle expérimental

III.4.1. Choix du modèle expérimental

S'il est bien établi aujourd'hui que le rôle des bactéries dans la transformation du lait ne se limite pas à la production d'acide lactique, il n'en reste pas moins que le choix d'un modèle expérimental pour l'étude de leur potentiel aromatique n'est pas aisé. Sachant que ce potentiel s'exprime nettement dans les produits frais et que ceux-ci ne nécessitent pas d'affinage, ce sont eux que nous avons retenus.

Ce sont donc posés successivement le choix du lait de départ, et le procédé de fabrication des caillés modèles. Il est clair que l'un et l'autre devaient présenter des caractères aussi constants que possible, puisque les facteurs de variabilité portaient sur les souches aromatisantes.

Le lait UHT, est additionné de chlorure de calcium à 0,2 g/l pour compenser les effets défavorables du traitement thermique sur la capacité à coaguler, constitue notre matière première (Hermier et Cerf, 1987). Ce lait UHT demi-écrémé est ensemencé par des souches sélectionnées sous forme de pré cultures ayant subi une centrifugation et un rinçage à l'eau physiologique. Les ajouts de présure à raison de 180 µl par litre de lait et de chlorure de calcium sont effectués au moment de l'ensemencement.

La fermentation est conduite à 23°C jusqu'à ce que le pH atteigne la valeur cible de 4,7. Le caillé alors obtenu est centrifugé, homogénéisé après élimination du sérum et stocké 5 jours à 7°C (figure 13). Il constitue le matériel d'étude sur lequel sont conduites les analyses effectuées et sensorielles du produit (Hermier et Cerf, 1987).

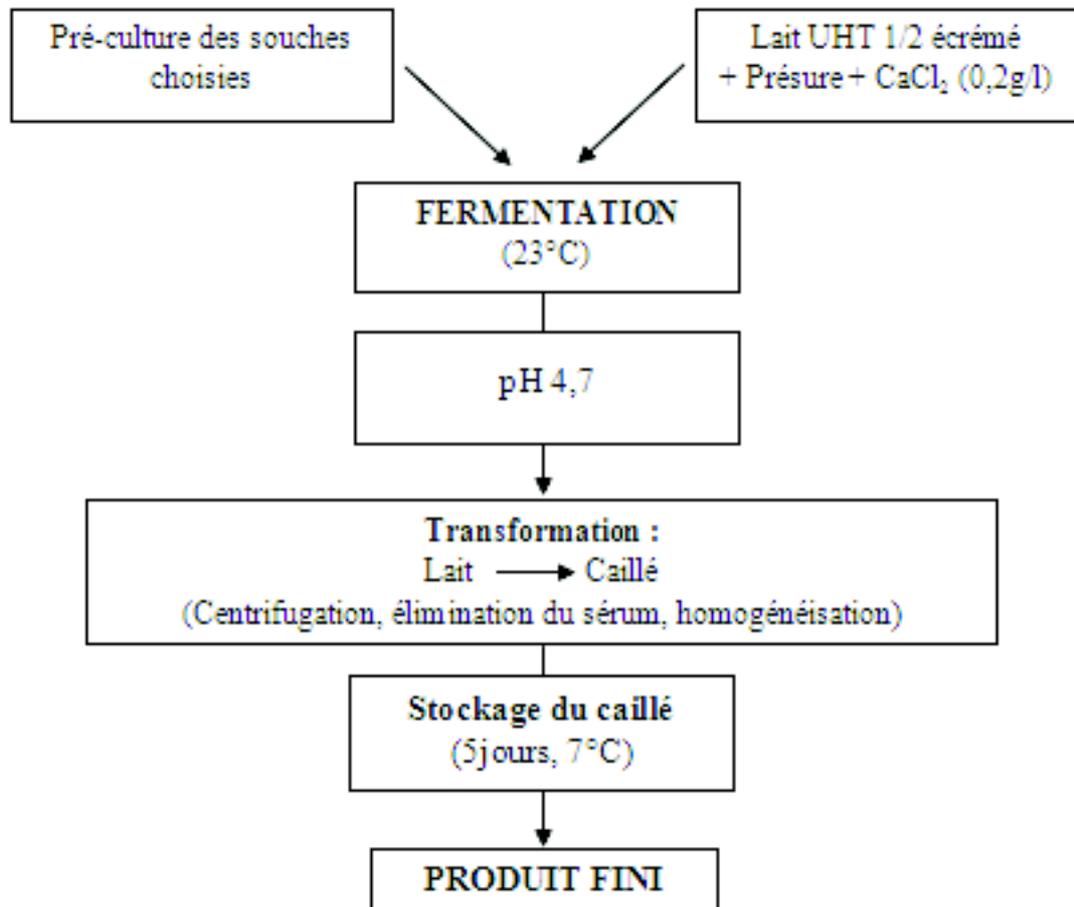


Figure 13. Schéma du protocole de fabrication d'un caillé modèle

(Ayerbe et Divies).

L'existence d'un phénomène d'effet synergique par l'association de ces souches a été prouvé par Walsh et Cogan (1973), ce qui nous a poussé à proposer ce levain constitué de trois (3) lactocoques et un (1) Leuconostoc, il s'agit des espèces : *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* associées à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides cremoris*.

Cependant, notre principal effort a porté dans notre étude, sur l'analyse de la production de diacétyl par les Leuconostoc et les Lactococcus, ainsi que sur les variations de cette production en fonction :

- 1) Des taux d'ensemencement.
- 2) de la température d'incubation des souches.
- 3) du pH.

III.4.2. Ferment utilisé pour la fabrication « témoin »

Nous avons utilisé comme ferments de « référence » les ferments servant aux fabrications traditionnelles. Ces souches mixtes ont été cultivées dans les conditions suivantes:

- Substrat: lait écrémé stérilisé à 110° C pendant 15 min.
- Taux d'ensemencement: $2 \cdot 10^{-2}$.

- Température d'incubation: 21° C.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Isolement, purification et caractérisation phénotypique et technologique

Les bactéries lactiques pour l'industrie laitière ont fait l'objet d'investigations approfondies relatives au choix de critères de sélection et de méthodes de caractérisation des souches (De Roissart, 1986).

Afin d'améliorer la qualité des produits laitiers fermentés, et de s'adapter à l'évolution du goût des consommateurs, il est nécessaire de disposer d'une souchothèque faite de souches choisies et mieux adaptées à la demande. Chaque souche doit être identifiée, caractérisée et répertoriée (figures 14 et 15).

I.1. Choix des isolats

A partir des différents échantillons retenus dans notre étude expérimentale (lait de vache sous ses deux formes « cru et caillé », et le leben artisanal) en vue de l'identification de la flore lactique microbienne, nous avons obtenu des isolats à partir desquels, seuls ont été retenus, les isolats à Gram positif, dépourvus de catalase et asporulants, en forme de bâtonnets ou de coques.

Les genres bactériens rencontrés dans nos échantillons sont représentés par des souches de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus* et *Lactobacilles*.

Les coques lactiques homo-fermentaires poussant en présence de 6,5 % de NaCl ont été classiquement considérées comme appartenant à *Enterococcus*. Cependant l'utilisation des galeries API 20Strep d'identification d'espèces bactériennes nous a permis de différencier parmi ces coques homo-fermentaires des souches s'apparentant à *Enterococcus faecalis* et des souches s'apparentant à *Lactococcus*. Ces dernières, qui résistent à 6,5 % de NaCl (ce qui les distingue habituellement des autres espèces décrites dans la littérature) ont été identifiées à *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*. *Lactococcus lactis* ssp *lactis* ; les coques lactiques hétéro-fermentaires appartenaient aux espèces *Leuconostoc Lactis* et *Leuconostoc cremoris*. Les *Lactobacilles* et *Pediocoques* sont présents dans tous les échantillons, ils ont été identifiés seulement au stade genre, mais pas celui de l'espèce.

I.2. Identification

I.2.1. Etude des caractères cultureux et morphologiques

Après purification des colonies isolées (figures 16 et 17), nous avons procédé à leur identification. Les cultures purifiées ont subi des examens macroscopiques (étude des caractères culturaux) et microscopiques, après coloration de Gram (étude des caractères morphologiques).

L'examen microscopique a montré que toutes les colonies prélevées à partir des milieux M17, MRS, et Mayeux, quelle que soit leur taille ou leur morphologie, pourraient être respectivement des streptocoques et Lactocoques, des Lactobacilles, et des Leuconostocs.

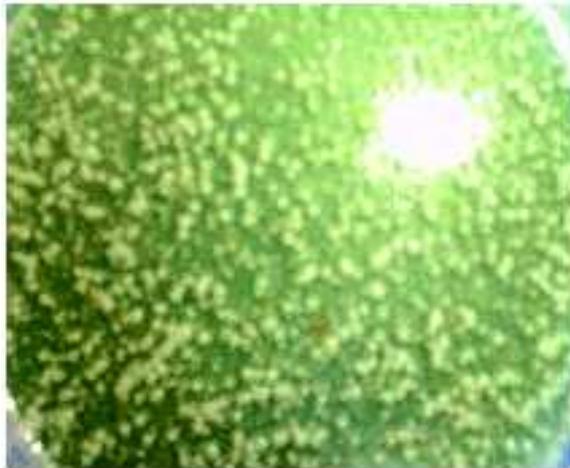


Figure 14. *Isolement des Lactocoques sur milieu M17*

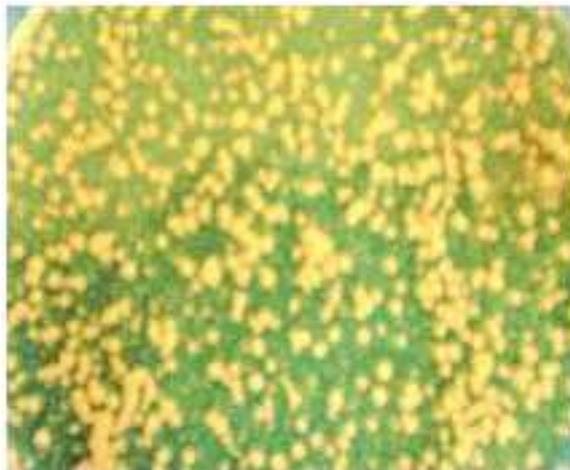


Figure 15. *Isolement des lactobacilles sur milieu MRS*

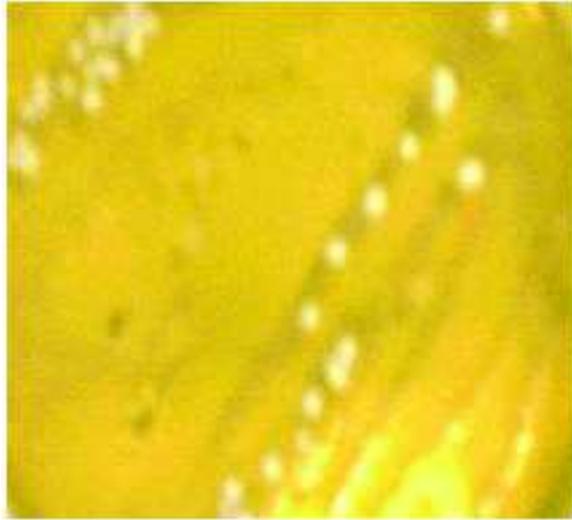


Figure 16. Purification des colonies de *Lactocoques* sur milieu M17

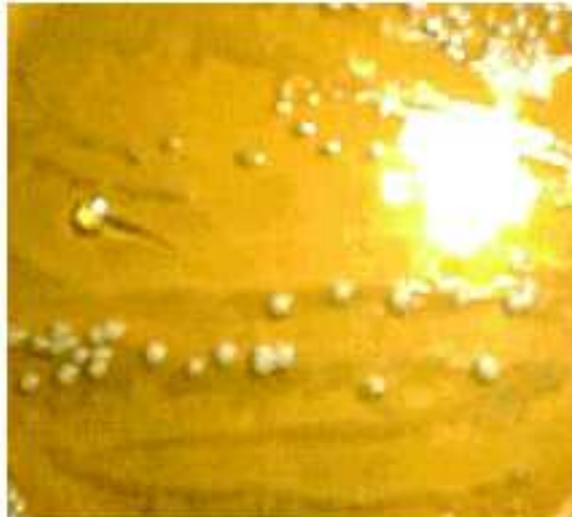


Figure 17. Purification des colonies de lactobacilles sur milieu MRS

Le tableau 13 rapporte les observations macroscopiques et microscopiques des souches isolées du lait cru de vache, lait caillé, leben traditionnel et des ferments lyophilisés.

Origine	Souches isolées	Milieu de culture	Aspect des colonies	Aspect des cellules et le mode de regroupement	Gram
Lait cru de vache	Streptocoques thermophiles	M17	Blanches, rondes ou lenticulaires	Coccies diplocoques en chaînettes	+
	Lactocoques	M17	Blanches, rondes ou lenticulaires	Coccies diplocoques en chaînettes	+
Leben traditionnel	Leuconostocs	Mayeux	Transparentes, très petites et rondes	Coccies ovales en chaînettes	+
	Lactobacilles mésophiles	MRS	Blanches, rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets en chaînettes	+
	Lactocoques	M17	Blanches, rondes ou lenticulaires	Coccies diplocoques en chaînettes	+
Lait caillé	Lactocoques	M17	Blanches, rondes ou lenticulaires	Coccies diplocoques en chaînettes	+
	Lactobacilles mésophiles	MRS	Blanches, rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets en chaînettes	+

Tableau 13. Caractères cultureux et morphologiques des espèces isolées.

I.2.1.1. Caractères morphologiques

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les coques (diplocoques et en chaînette) constituent 80% de l'effectif total et sont représentées par les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Les formes observés en bâtonnets allongés groupés en paires ou en chaînes sont représentées par le genre *Lactobacillus* avec 20% de l'effectif total. L'aspect des colonies et l'aspect des cellules sont en accord avec ceux montrés par Leveau et al (1991) et Champagne et al (2000).

I.2.1.2. Caractères cultureux

Parmi les souches sélectionnées, deux appartiennent au genre *Enterococcus* et présentent un développement positif : à 10 °C et 45 °C ; à pH 9,6 ; en présence de 6,5 % de NaCl et une thermorésistance égale à 60 °C durant 30 min (pour l'ensemble des souches). Les souches à citrate négatif se rapprochent de l'espèce *Enterococcus faecium*, et celles produisant du citrate avec un développement positif en présence de Tellurite de potassium, se rapprochent de l'espèce *Enterococcus faecalis*. Les entérocoques doivent être considérés comme faisant partie de la flore microbienne normale du lait cru.

Pour ce qui est du genre *Lactococcus*, huit (8) espèces ont été déterminées par leur non résistance à la température de 45°C, dont une souche caractéristique de *Lactococcus*

lactis ssp *diacetylactis*, deux espèces présentent un développement positif à 6,5 % de NaCl et produisent de l'acétoïne, ce qui permet de les rapprocher de l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. Quatre souches et, qui diffèrent de l'espèce précédente par la croissance négative à pH 9,6, se rapprochent de l'espèce *Lactococcus subsp lactis* (tableau 14).

Parmi les isollements effectués à partir du milieu d'Elliker et Anderson, nous avons pu identifier les souches de *Streptococcus lactis* et de *Streptococcus diacetylactis* ; Quant aux souches de *Leuconostoc* isolées à partir du milieu hypersaccharosé, elles se répartissent en souches de *Ln.cremoris* et *Ln.lactis*.

Les isolats de *Leuconostoc*s présentent un développement positif à 37 °C et la plupart résistent au traitement thermique de 55 °C pendant 15 min, ils étaient repartis en deux espèces : *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc cremoris* (tableau 15).

I.2.2. Distribution des souches lactiques identifiées

Grâce aux tableaux d'identification de Guiraud (1998) et Bernnan et al, (2001) (annexe), et par comparaison avec les souches de référence, nous avons pu identifier les souches locales.

Les groupes microbiens connaissent un développement important au cours de l'élaboration du *Leben*, à l'exception des *Lactobacilles* qui marquent leur absence dans l'échantillon « *leben* ».

Les *Streptocoques* lactiques constituent la flore la plus abondante dans le *Leben*. Leur évolution se superpose à celle de l'acidité jusqu'à un certain niveau, variable suivant les échantillons, à partir duquel on note un ralentissement, dû certainement à l'effet inhibiteur de l'acide lactique.

Globalement et sur un nombre de 625 d'isolats, seuls 25 isolats représentatifs de la flore dominante ont été identifiés, et qui sont rattachés à 5 groupes et distribués par ordre de dominance comme suit : 5 isolats soit 20% de *Lactobacilles* ; 4 isolats soit 16% *Leuconostoc*s, et 16 isolats de coques soit 64% dont 8 isolats de *Lactocoques* à raison de (32%) ; 4 isolats *Leuconostoc*s (16%) ; 2 isolats d'*Enterocoques* (8%) ; 3 isolats de *Pediocoques* (12%) et 3 isolats de *Streptocoques* soit (12%).

Les souches isolées de *Lc.Lactis* représentent (50% pour la sous-espèce *lactis*, 37,5% pour la sous-espèce *cremoris* et 12,5% pour la sous-espèce *lactis* biovar *diacetylactis*).

Les souches que nous avons identifiées se répartissent entre des espèces homo-fermentaires acidifiantes (*Streptococcus lactis* et *Streptococcus diacetylactis*) ,et des espèces arômatisantes hétéro-fermentaires (*Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc cremoris*) ou homo-fermentaires (*Streptococcus diacetylactis*).

Les souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* sont dominantes dans le lait cru et *leben* ; La présence d'une di/tripeptidase fixée à leur paroi leur permet d'être non exigeantes sur le plan nutritionnel (Deroissart et Luquet, 1994), ce qui explique leur existence en plus grand nombre. Les souches de *Lc lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis* et de *Lc lactis subsp cremoris* en sont dépourvues et leur isolement est plus difficile, leur concentration étant faible (Bernnan et al, 2001).

Les résultats obtenus pour la caractérisation des souches isolées du lait de vache, du *leben*, du lait caillé et du ferment sont résumés dans les tableaux 14 et 15.

Critères phénotypique	Résultats					
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
Croissance à : 45°C	-	-	-	-	-	-
37°C	-	-	+	+	+	+
10°C	+	+	+	+	+	+
Croissance à : 6,5% NaCl	+	+	-	-	-	-
4% NaCl	-	-	+	+	+	+
Croissance à : pH = 9,6	-	-	-	-	-	-
Croissance à : 60°C/30mn	-	-	-	-	-	-
Gibson et Abdelmalek	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Croissance sur lait bleu	-	-	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	-	-	+	+	+	+
Acétoïne	+	+	-	-	+	+
Citratase	-	-	-	-	+	+
Lait toumesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
Fermentations sucrées:						
Lactose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	-	-	+	+	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Espèces :	LcC	LcC*	LcL	LcL*	LcD	LcD*

Tableau 14. Résultats d'identifications des *Lactocoques* (*Streptocoques mésophiles*) et *Streptocoques thermophiles*.

+ : réaction positive, - : réaction négative, A : acidification, C : coagulation, R : réduction, Homo : homo-fermentaire, LcC : *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, LcC* : *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (ferment), LcL : *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, LcL* : *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (ferment), LcD : *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*, LcD* : *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* (ferment).

Critères phénotypique	Résultats	
Gram	+	+
Catalase	-	-
Croissance à : 45°C	-	-
37°C	+	+
10°C	+	+
Croissance à : 6,5% NaCl	-	-
3% NaCl	-	-
Croissance à : pH = 6,5	+	+
4,8	-	-
Thermorésistance : 60°C/30mn	-	+
Gibson et Abdelmalek	Hétéro	Hétéro
Dextrane	-	-
Esculine	-	-
Arginine	-	-
Citratase	+	-
Fermentations sucrées :		
Lactose	+	+
Saccharose	-	+
Arabinose	-	-
Xylose	-	-
Fructose	-	+
Espèces :	LnC	LnL

Tableau 15. Résultats d'identifications des *Leuconostocs*.

+ : réaction positive, - : réaction négative, Hétéro : hétéro-fermentaire

LnC : *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*, LnL : *Leuconostoc lactis*.

II. Etude des aptitudes technologiques des souches

II.1. Etude des aptitudes technologiques des souches en culture pure

Après avoir isolé et identifié les souches locales de bactéries lactiques, nous avons estimé nécessaire de les tester sur un certain nombre de caractères recherchés en technologie laitière et qui sont considérés comme étant des critères de sélection de ces microorganismes, il s'agit principalement des aptitudes à l'acidification et des aptitudes à la production d'arômes.

Les espèces les plus couramment utilisées en industrie laitière pour l'étude des aptitudes technologiques sont les *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*.

Dans notre travail, on s'est basé particulièrement sur l'aptitude technologique des souches lactiques productrices d'arômes appartenant au genre *Lactococcus* et *Leuconostoc*.

II.1.1. Pouvoir acidifiant des Lactocoques (Streptocoques mésophiles) et Leuconostocs

L'une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière est la production d'acide lactique, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien. On comprend donc que l'activité acidifiante soit le critère déterminant de sélection des bactéries lactiques (Boudier, 1985).

L'évolution de l'acidité dornic et celle du pH en début et à 24 heures d'incubation des cultures de Lactocoques et Leuconostocs est indiquée dans les tableaux 16 à 23 (voir annexes) et figures 18 à 25.

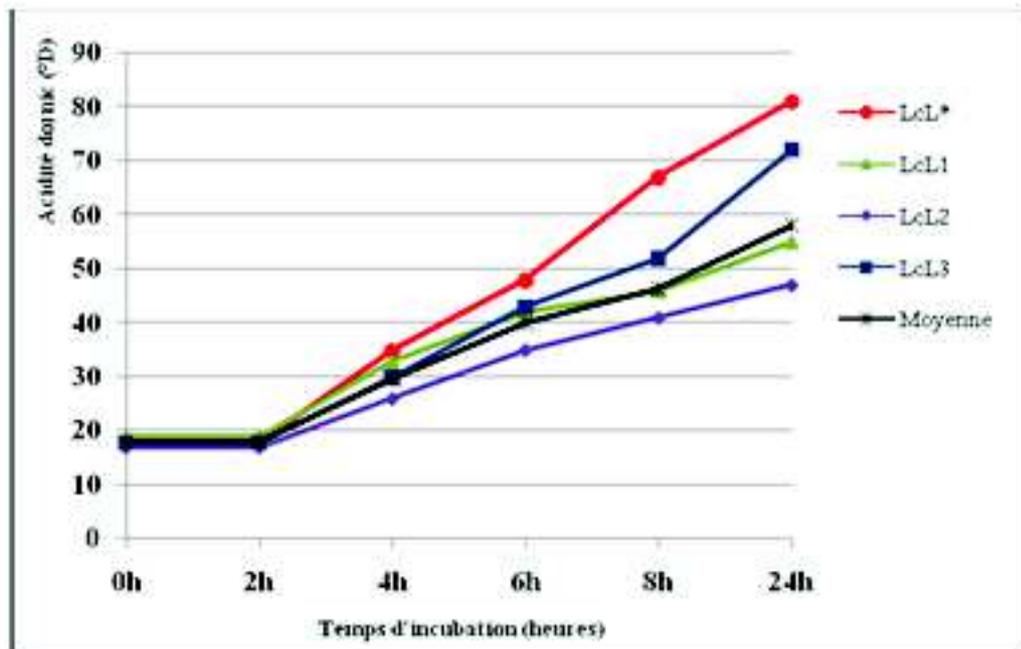


Figure 18. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis* ssp *lactis* en fonction du temps d'incubation

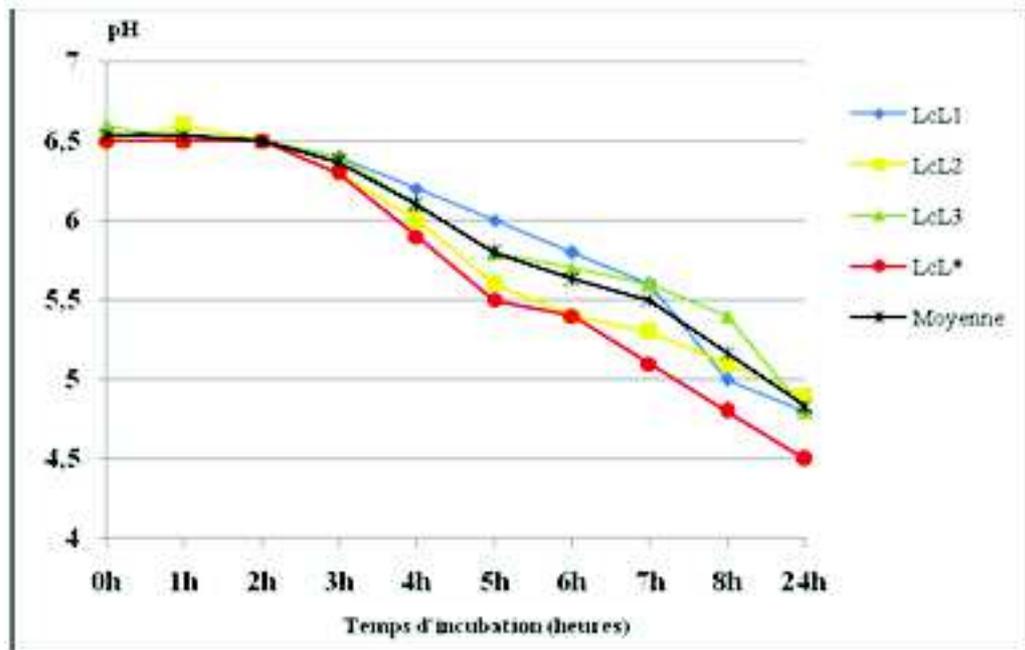


Figure 19. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp lactis* en fonction du temps d'incubation

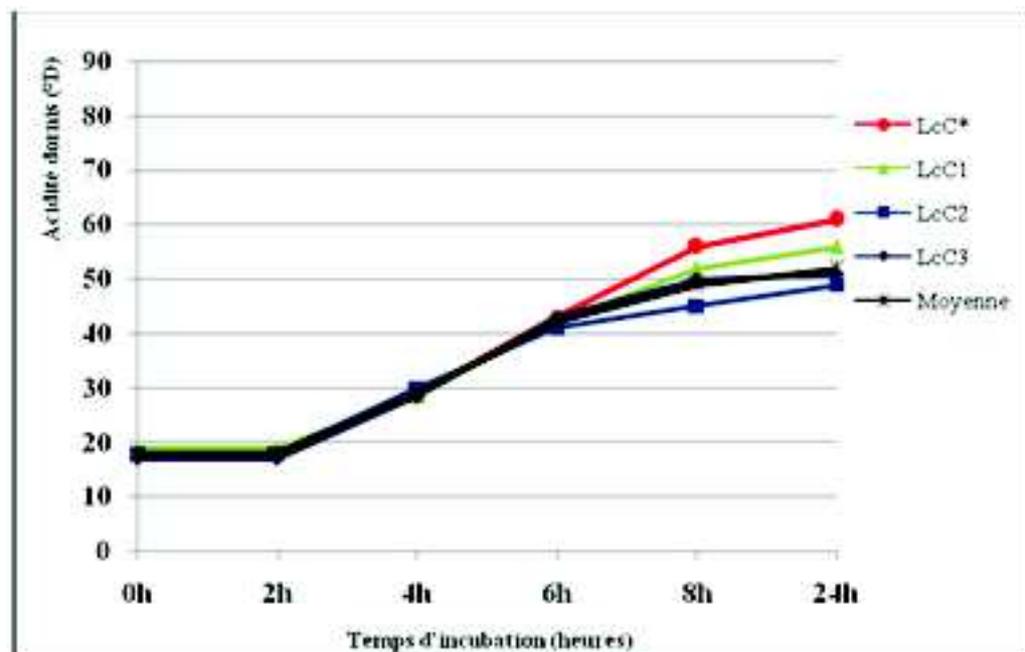


Figure 20. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis ssp cremoris* en fonction du temps d'incubation

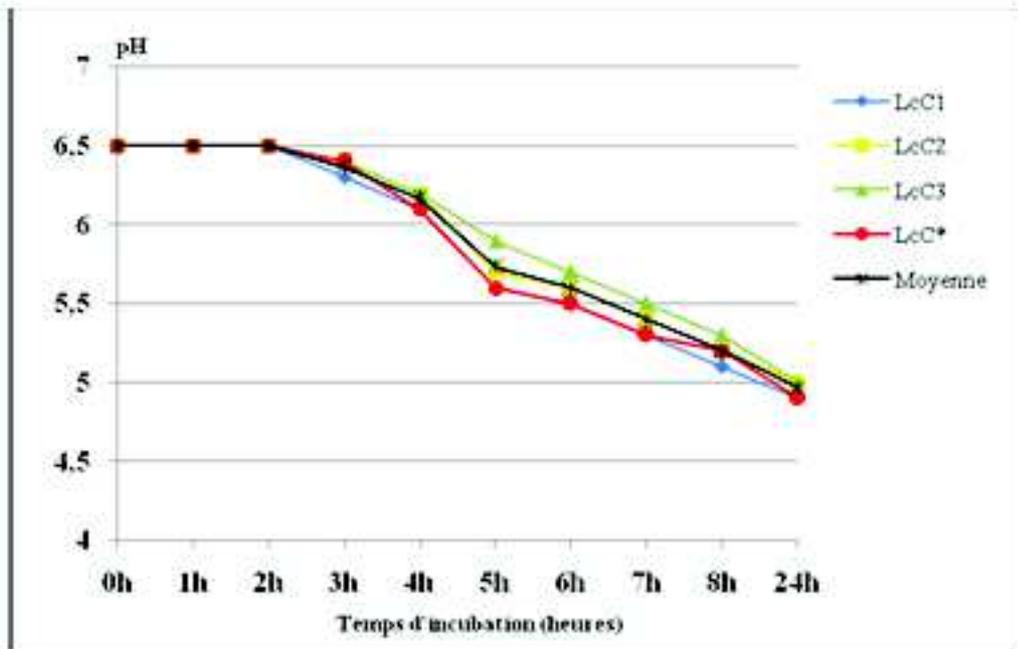


Figure 21. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp cremoris* en fonction du temps d'incubation

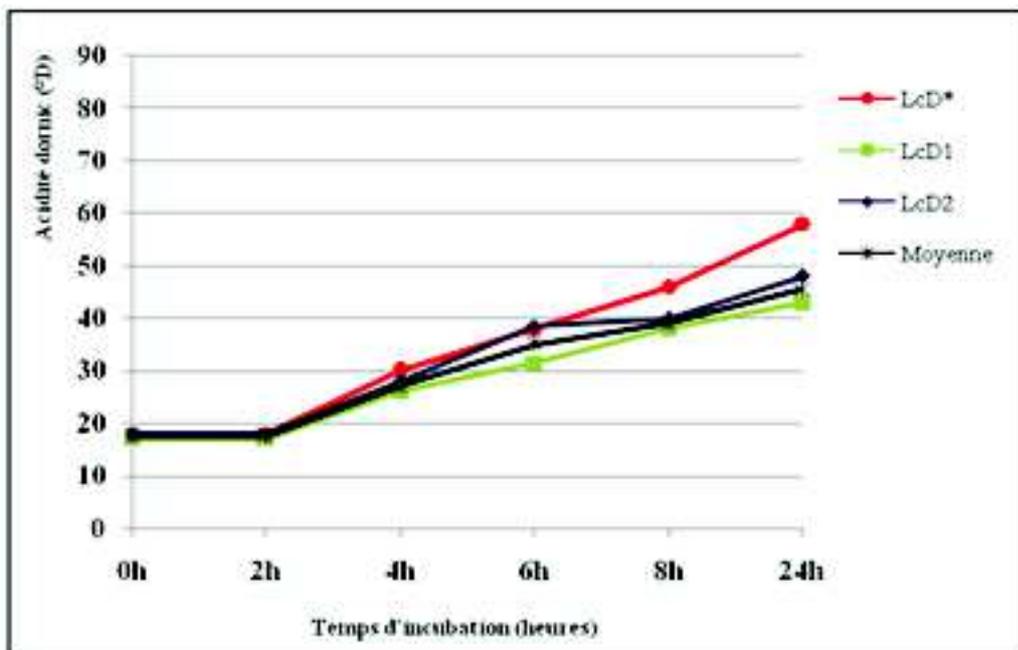


Figure 22. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* en fonction du temps d'incubation

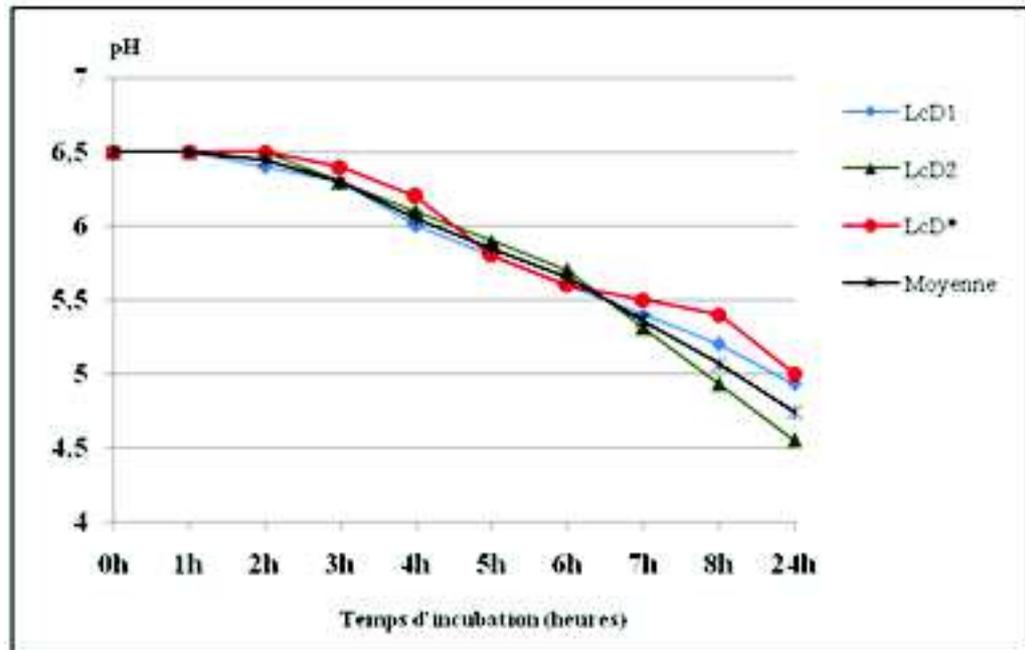


Figure 23. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* en fonction du temps d'incubation

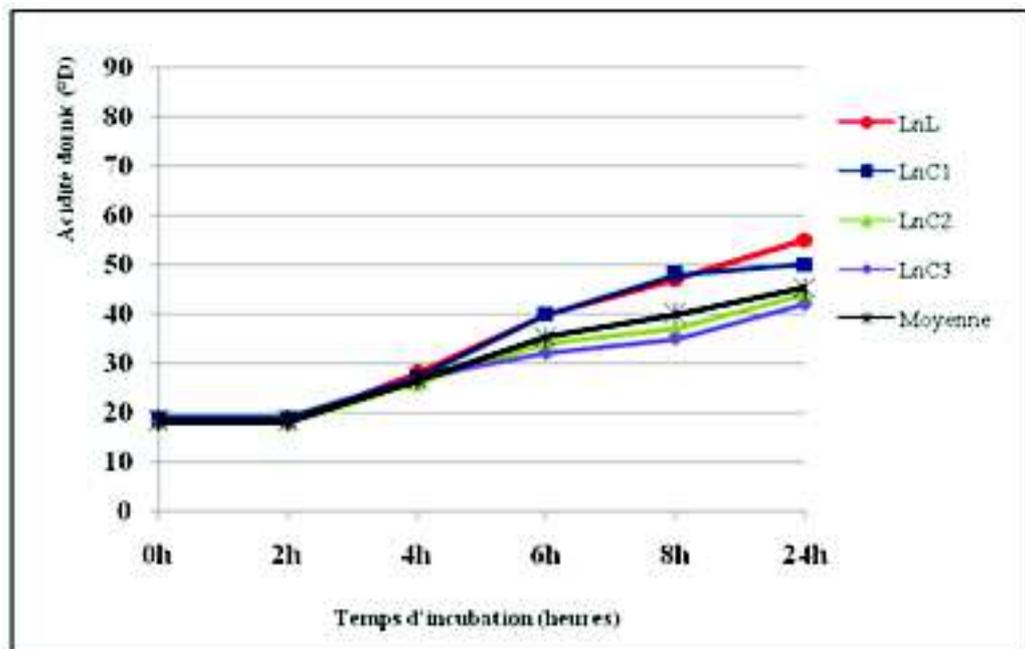


Figure 24. Evolution de l'acidité dornik chez les *Leuconostocs* en fonction du temps d'incubation

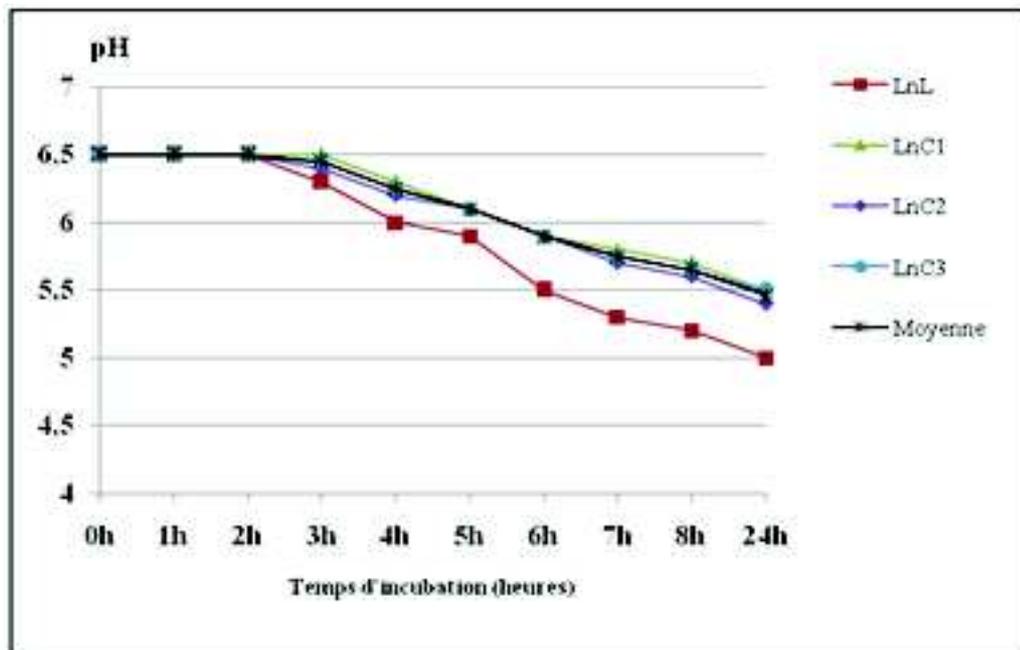


Figure 25. Evolution du pH chez les *Leuconostocs* en fonction du temps d'incubation

Nous observons que l'acidité du lait enregistrée pour l'ensemble des souches appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* durant les deux premières heures d'incubation est autour de 18°C avec un pH variant de 6,4 et 6,5 (figures 18,20,22,24) et figures 19,21,23,25).

L'acidité titrable maximale enregistrée en 24 heures de temps est de 72°C, correspondant à un pH de 4,8, elle est produite par la souche locale LcL3. Quant à la souche commerciale LcL*, elle a atteint 81°C à un pH de 4,5.

Par contre, les souches appartenant aux espèces LcC1, LcD2, LnL et LnC1 produisent une quantité d'acide lactique en 24 heures de temps de 56°C, 48°C, 55°C, 50°C respectivement.

Les souches du ferment LcD*, LcL* et LcC* atteignent respectivement 58°C, 81°C et 61°C.

Nous remarquons d'après les résultats obtenus que toutes les souches débutent avec une phase de latence (phase d'adaptation) aux conditions de culture quelle que soit l'espèce. Après cette phase, les souches croient de façon exponentielle et c'est au cours de cette phase qu'on peut distinguer des différences entre les espèces et les souches de la même espèce (figures 18, 20, 22, et 24).

D'après Cogan (1980), les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* sont considérées comme les plus acidifiantes. Lucas et Reyrolle (1989), ont essayé de tester la résistance des Lactocoques aux acidités élevées, cependant, leurs résultats indiquent que les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* sont résistantes à une acidité de 75°C, en revanche les souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* sont sensibles à cette acidité.

En effet, selon nos résultats, nous constatons que la souche LcL1 est la plus acidifiante. Selon De Roissart (1986), cette différence de sensibilité à l'acidité est une caractéristique propre à chaque souche bactérienne car elle est liée aux aptitudes particulières qu'elle possède à dégrader les composés du milieu pour les rendre assimilables et à transporter

les éléments nutritifs dans le cytoplasme. Ces différences sont dues à l'existence d'une déficience ou l'absence de système de transport des substances azotées ou/et des sucres fermentescibles (Lawrance et al, 1976).

Pour les *Leuconostocs*, Lacrampe et Webber (1973) et Devoyod et Poullain (1988) ont expliqué la faible production d'acide lactique, par la nature même des espèces de *Leuconostocs* qui sont sensibles aux faibles pH, et ne fermentent le lactose qu'en très faible quantité par voie hétéro-fermentaire aboutissant seulement à 50% d'acide lactique à partir des glucides.

Mis à part *Leuconostoc lactis* qui est capable d'acidifier le lait, les autres espèces de *Leuconostocs* l'acidifient que très lentement (Devoyod et poullain, 1988).

II.1.2. Pouvoir aromatique des Lactocoques (Streptocoques mésophiles) et *Leuconostocs*

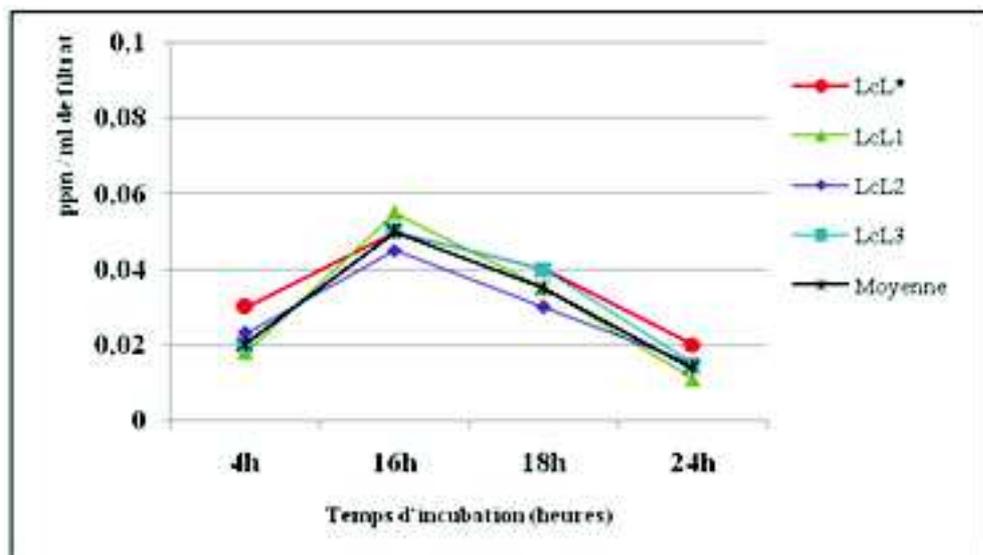


Figure 26. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis* ssp *lactis*

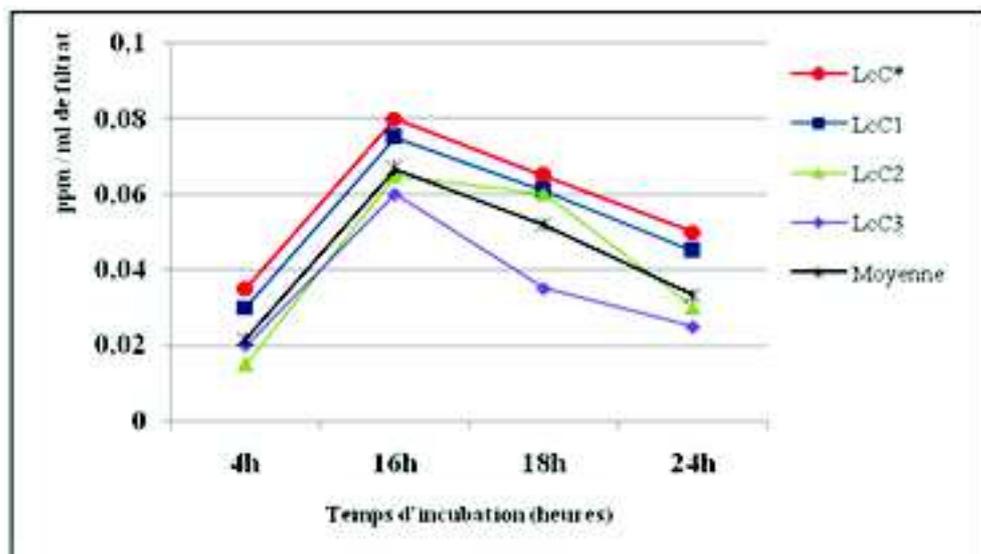


Figure 27. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis ssp cremoris*

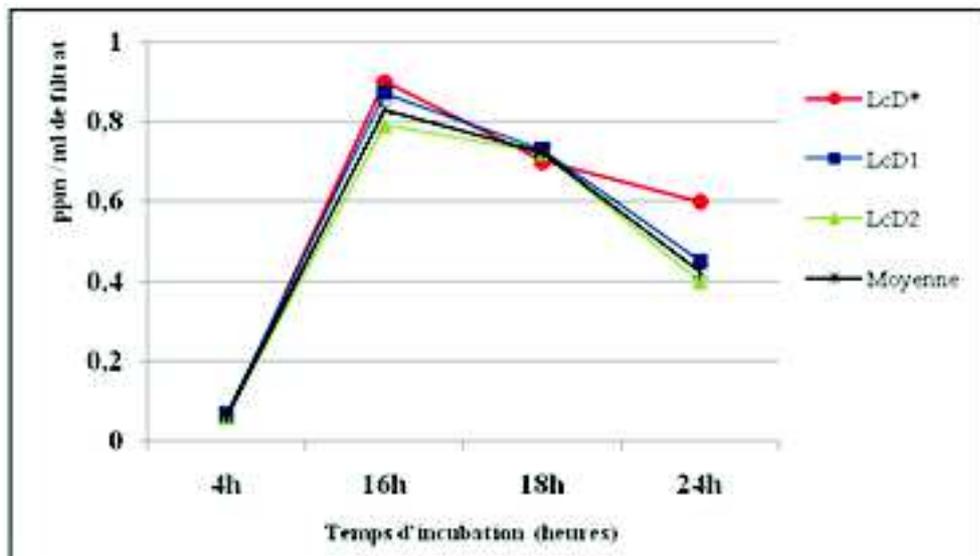


Figure 28. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis ssp diacetylactis*

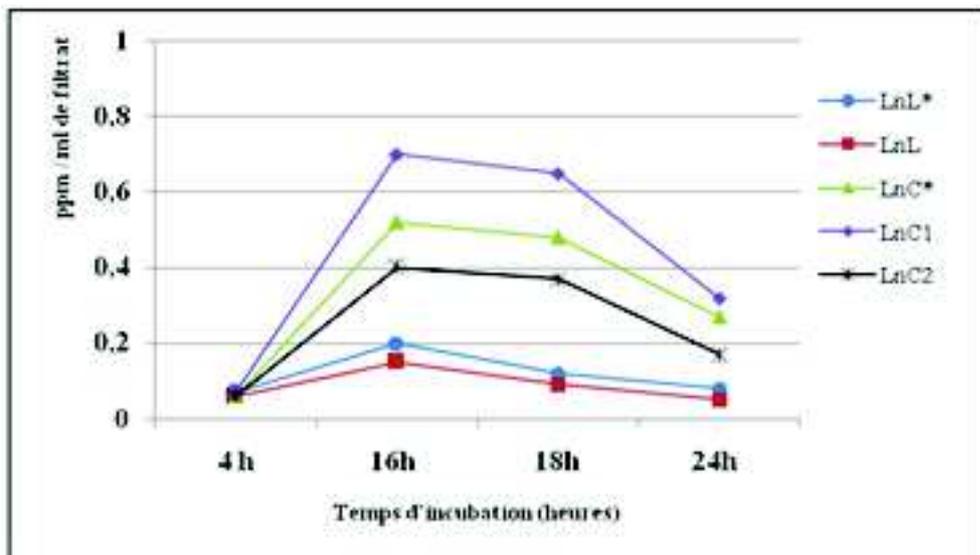


Figure 29. Evolution de la production du diacétyle chez les *Leuconostocs*

D'après les résultats analytiques relatifs à la production du diacétyle nous constatons que l'optimum de production du diacétyle pour l'ensemble des espèces est atteint au bout de 16 heures d'incubation (figures 26, 27, 28 et 29). Les teneurs maximales de diacétyle sont respectivement de 0,87 ppm et 0,70 ppm pour LcD1 et LnC1 (tableaux 24, 25, 26 et 27) (voir annexes).

Par contre, les autres espèces *Lactococcus lactis ssp cremoris*, *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Leuconostoc lactis* atteignent des teneurs maximales de 0,06-0,075 ppm, 0,045-0,055 ppm et 0,15 ppm respectivement. Ces valeurs se rapprochent de celles observées avec les souches de référence qui atteignent 0,90 ppm, 0,05 ppm et 0,08 ppm pour LcD*, LcL* et LcC* respectivement.

Cogan (1975) a obtenu avec une souche *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (DRC3) (INRA Jouis En Josas), une teneur de 1ppm/ml de filtrat à 16 heures d'incubation, la souche locale LcD1 n'en s'éloigne pas trop.

De nombreux travaux ont montré que les souches de *Leuconostocs mesenteroides ssp cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* produisent des quantités importantes de diacétyle, alors que la plupart des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *Leuconostoc lactis* jouent un rôle que dans l'acidification du milieu et ne produisent que des quantités très faibles de diacétyle (Schmidt et al, 1994).

Une phase descendante où la teneur en diacétyle chute est apparue après 16 heures d'incubation.

Selon Lacrampe et Weber (1973), l'évolution de la production de diacétyle est la succession de deux phases :

- Une phase ascendante au cours de laquelle, il y a synthèse de diacétyle.
- Une phase de déclin pendant laquelle il y a appauvrissement du milieu en diacétyle, résultant de deux phénomènes se produisant simultanément : épuisement du milieu en composé précurseur du diacétyle (citrate) et l'action de la diacétyle réductase.

II.2. Etude des aptitudes technologiques des souches en culture mixte

II.2.1. Choix des Lactocoques (Streptocoques mésophiles) et Leuconostocs en culture mixte binaire

Les souches de Lactocoques et Leuconostocs ont montré les meilleures acidités et les meilleures productions en diacétyle, et pour la suite de notre étude nous avons retenu les souches suivantes : Lc1, LcC1, LcD, LnC1, LnL.

II.2.2. Aptitude acidifiante des cultures mixtes mésophiles

Les valeurs de titration obtenues par les cultures mixtes données dans les tableaux 28 à 39, ainsi que les courbes qui en résultent (figures 30 à 41), montrent que toutes les combinaisons de souches produisent des quantités d'acide lactique très rapprochées les unes des autres, et supérieures à celles produites en cultures pures dans tous les cas.

Ces associations se manifestent en premier par une réduction du temps de latence (moins de 2 heures), par rapport aux cultures pures.

Pour l'ensemble des cultures mixtes mésophiles, les meilleures acidités titrables sont obtenues, avec le rapport l/s = 1/1.

L'association (LnL+LcL), atteint en 24 heures d'incubation une acidité maximale de 98°D pour un pH de 4,3 (tableaux 28 et 29); suivit des associations (LnL+LcD), (LnL+LcC), (LnC1+LcL), (LnC+LcC) et (LnC+LcD) qui produisent respectivement (92°D, 90°D, 88°D, 76°D, 70°D).

Devoyod et Poullain (1988) ont déjà montré l'effet stimulant des interactions entre les Streptocoques lactiques (Lactocoques) et Leuconostocs, en affirmant la nécessité de maintenir un certain rapport entre ces micro-organismes pour que les Leuconostocs puissent exprimer pleinement tout leur métabolisme.

En effet, les *Leuconostocs* en culture pure sont caractérisés par une faible vitesse dans la production d'acide, leur association avec les *Lactocoques* a eu un effet stimulant.

Les travaux de Lacrampe et Weber (1973) ont montré que les *Leuconostocs* cultivés en présence des *Lactocoques* sont stimulés dans leur croissance grâce à la présence de ces germes acidifiants et protéolytiques (*Lactocoques*), car les *Leuconostocs* nécessitent pour se développer des acides aminés comme facteurs de croissance.

La culture mixte (LnL+LcL), bien qu'elle présente un bon pouvoir acidifiant ne semble pas avoir un intérêt particulier en industrie laitière ; ceci est probablement dû à la nature de ces espèces qui sont acidifiantes mais qui ne présentent pas d'intérêt aromatique, sachant que dans la plupart des cas, les associations de *Lactocoques* et *Leuconostocs* comportent des espèces acidifiantes et d'autres aromatisantes, le but n'est donc pas de favoriser l'acidification seulement (Divies et al, 1994).

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	19	31	44	74	75	98
Rapport 1/2	20	31	47	74	75	85
Rapport 2/1	20	34	50	68	70	75

Tableau 28. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

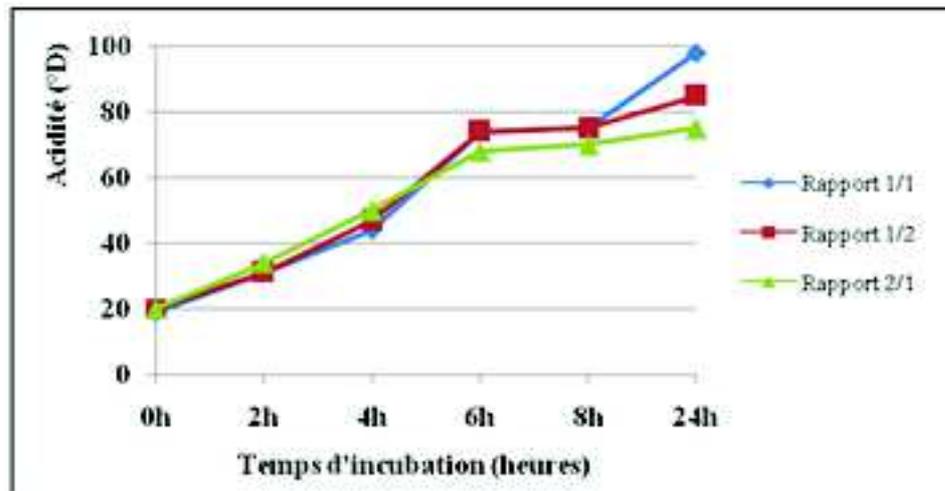


Figure 30. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,6	5,9	5,3	4,9	4,7	4,3
Rapport 1/2	6,4	6	5,3	4,8	4,6	4,2
Rapport 2/1	6,4	5,8	5,4	5,1	4,9	4,6

Tableau 29. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL); selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

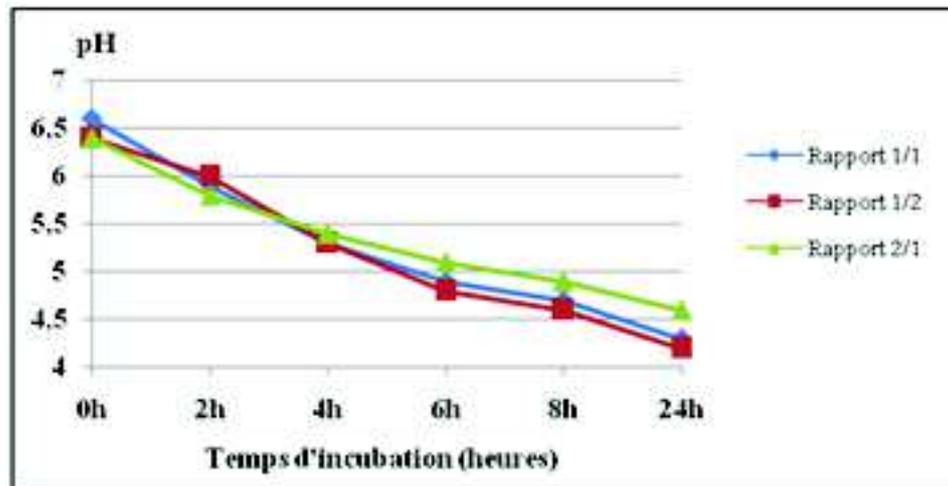


Figure 31. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures \ Rap.l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	25	30	58	68	70	90
Rapport 1/2	25	29	49	69	73	84
Rapport 2/1	21	28	40	55	63	80

Tableau 30. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC); selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

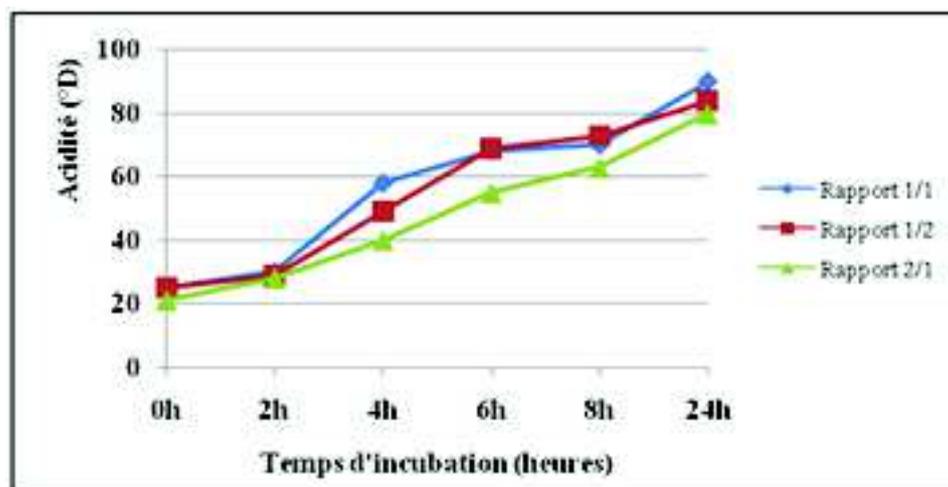


Figure 32. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC); selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,4	5,9	5,5	5,2	4,9	4,5
Rapport 1/2	6,4	6,1	5,8	5,4	5	4,6
Rapport 2/1	6,5	5,9	5,6	5,4	5	4,7

Tableau 31. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

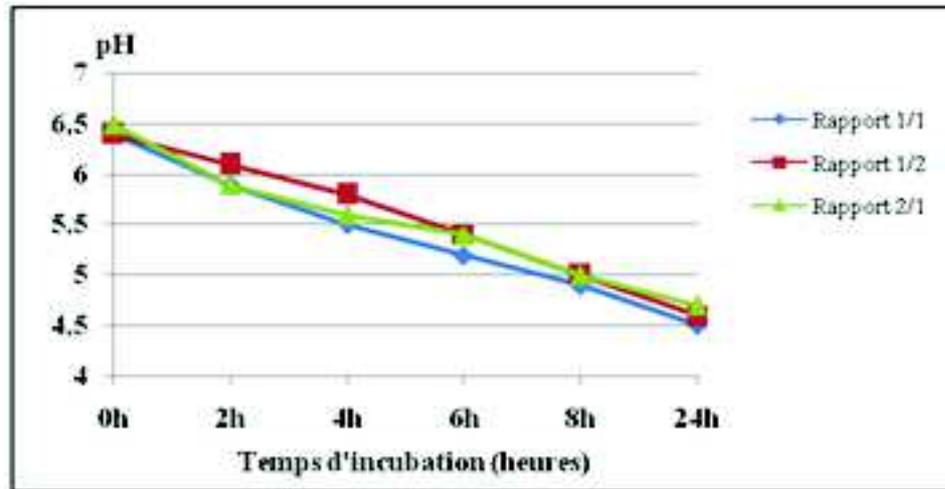


Figure 33. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	19	30	33	65	70	92
Rapport 1/2	20	31	30	60	68	78
Rapport 2/1	19	28	30	38	43	73

Tableau 32. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

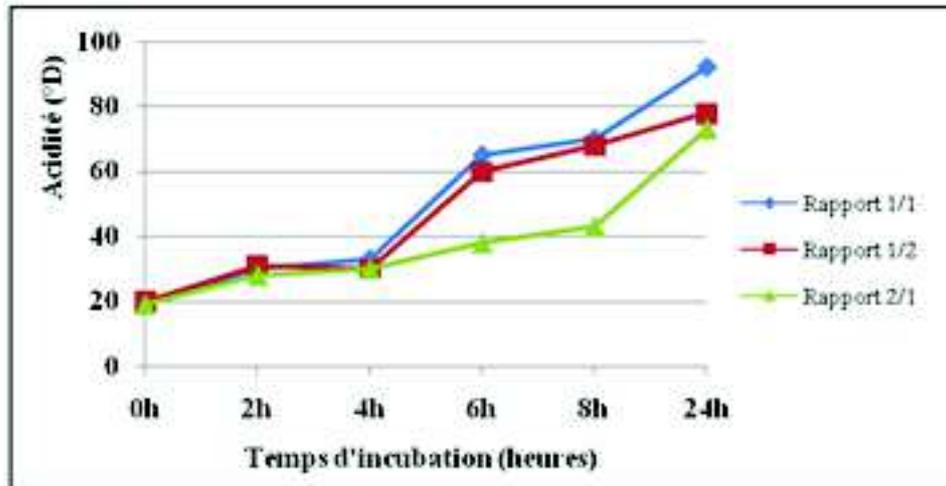


Figure 34. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* (LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures \ Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,5	6,4	6,1	5,7	5,3	4,4
Rapport 1/2	6,4	6,1	5,9	5,2	5,1	4,5
Rapport 2/1	6,5	6,2	6,1	5,4	5,2	4,8

Tableau 33. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*(LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

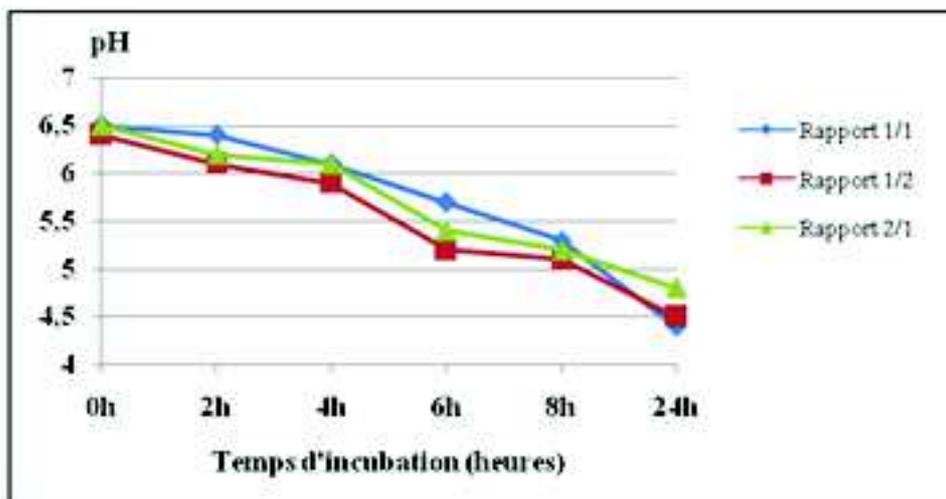


Figure 35. Evolution du PH de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*(LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	24	30	55	60	65	88
Rapport 1/2	25	29	40	54	59	80
Rapport 2/1	25	29	35	46	50	74

Tableau 34. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (LnCl + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

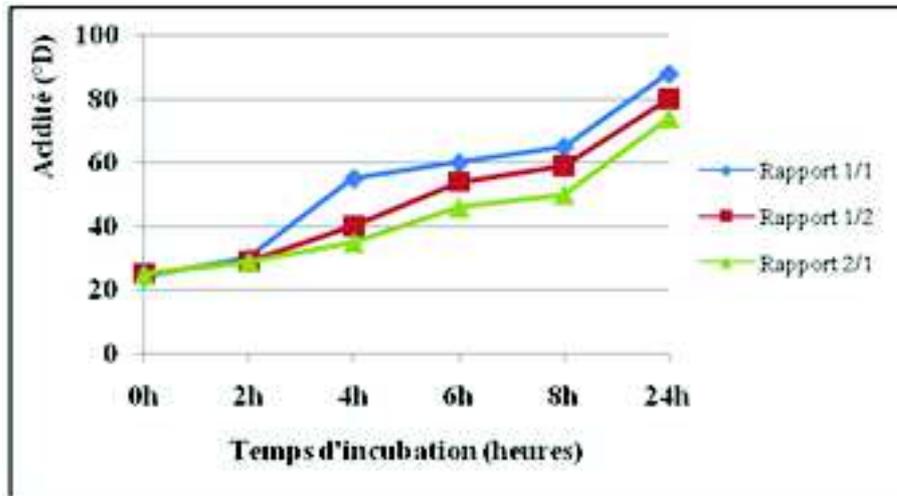


Figure 36. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (LnC + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,5	6	5,2	4,8	4,5	4,2
Rapport 1/2	6,6	6,1	5,5	5	4,7	4,4
Rapport 2/1	6,5	6,1	5,6	5,2	5	4,8

Tableau 35. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (LnC + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

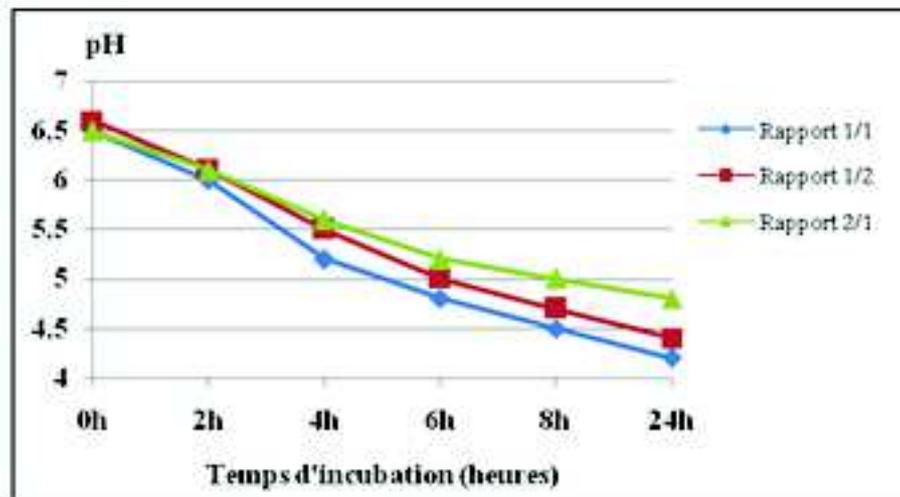


Figure 37. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnC + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures \ Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	23	29	47	61	63	76
Rapport 1/2	22	27	38	53	55	71
Rapport 2/1	23	27	46	54	56	65

Tableau 36. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

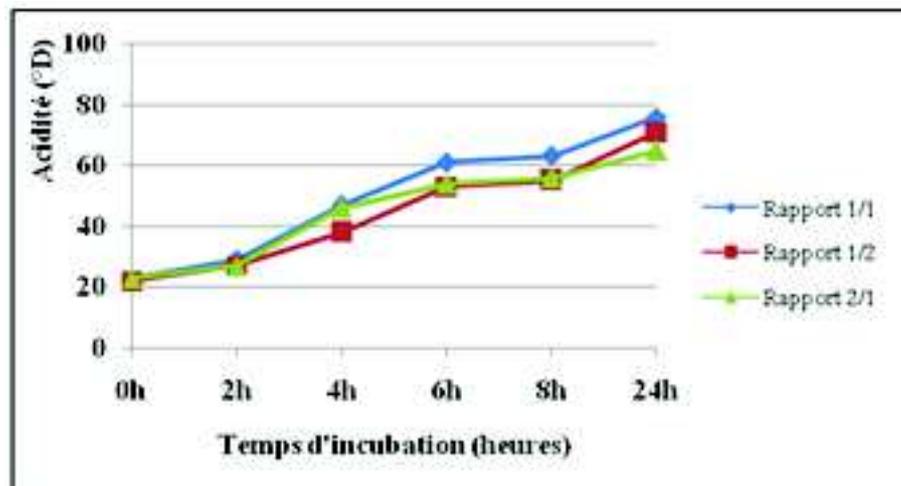


Figure 38. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,3	6	5,4	5,1	4,8	4,7
Rapport 1/2	6,3	5,9	5,5	5,3	5	4,5
Rapport 2/1	6,3	6,1	5,6	5,1	5	4,8

Tableau 37. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

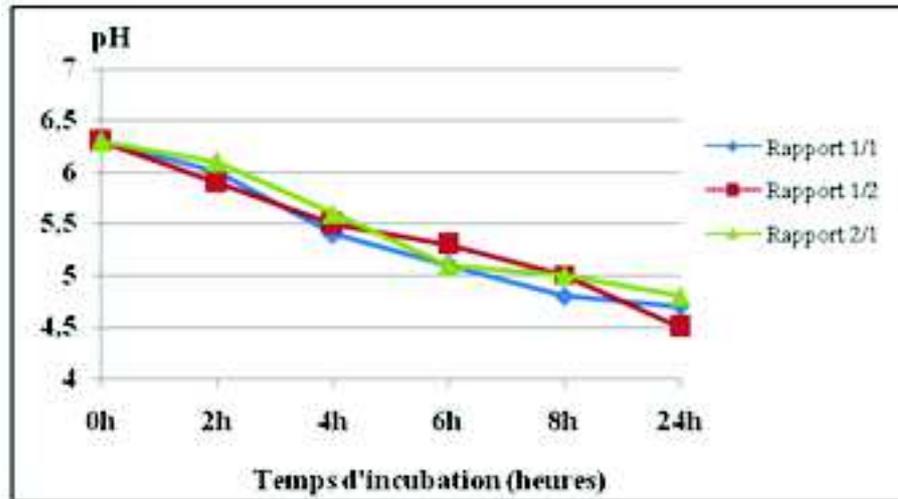


Figure 39. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	20	24	37	63	65	70
Rapport 1/2	21	28	32	56	60	66
Rapport 2/1	21	24	35	59	61	63

Tableau 38. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

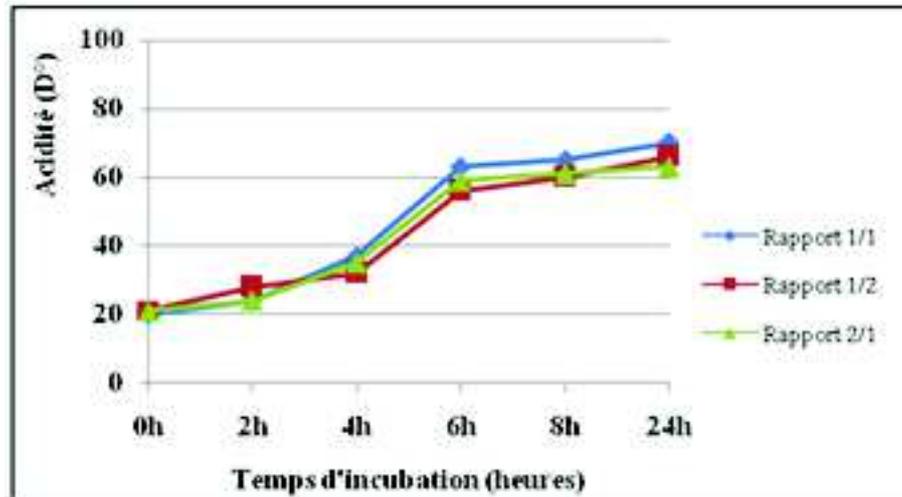


Figure 40. Evolution de l'acidité dornic de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures \ Rap. l/s	0h	2h	4h	6h	8h	24h
Rapport 1/1	6,5	6,3	5,8	5,3	5,2	4,8
Rapport 1/2	6,4	6,1	6	5,5	5,3	5
Rapport 2/1	6,4	6,3	5,9	5,4	5,3	5,1

Tableau 39. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

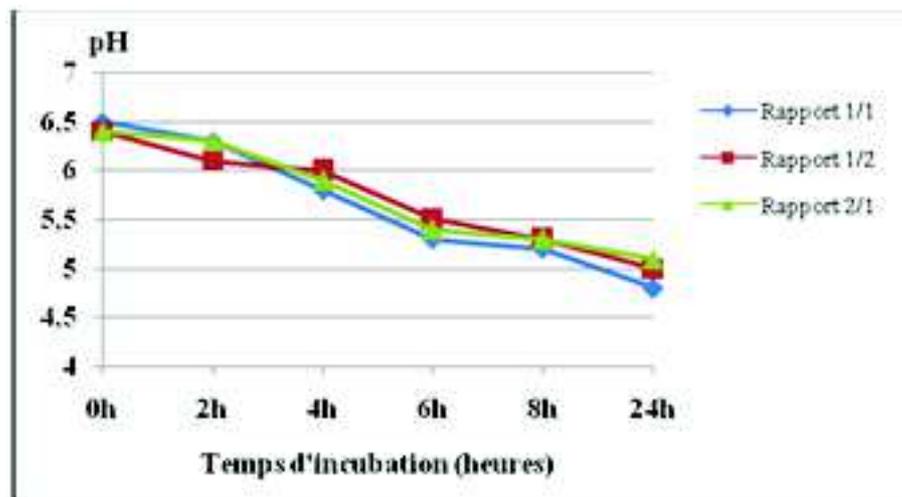


Figure 41. Evolution du pH de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

II.2.3. Aptitude aromatique des cultures mixtes mésophiles

Les tableaux 40 à 45 et les graphes correspondants (figures 42 à 47), montrent l'évolution de la production de diacétyle, il apparait que les meilleures teneurs sont obtenues avec le rapport 1/s = 1/1.

Au bout de 16 heures d'incubation, les teneurs maximales de diacétyle sont respectivement de 0,75 ppm ; 0,45 ppm ; 0,35 ppm ; pour les associations (LnC+LcC), (LnC+LcL), (LnC+LcD).

Pour la culture mixte (LnC+LcD), le maximum de diacétyle produit n'atteint que 0,35 ppm, alors que LcD1 et LnC1 produisent en culture pure respectivement 0,87 ppm et 0,7 ppm à 16 heures d'incubation.

Les teneurs en diacétyle les plus élevées sont produites par les cultures mixtes (LnC+LcL) et (LnC+LcC), et sont plus élevées que chacune des cultures pures.

Selon Tantaoui et al (1984), les cultures mixtes notamment celles de *Leuconostoc mesenteroides cremoris* et *Lactococcus lactis ssp lactis* favorisent la production de diacétyle et sont très actifs. Quant aux cultures mixtes associant *Leuconostoc lactis* à chacun des Lactocoques, on remarque que la maximum de diacétyle est également produit à 16 heures d'incubation atteignant : 0,8 ppm ; 0,13 ppm ; 0,08 ppm respectivement pour les associations (LnL+LcD), (LnL+LcC), (LnL+LcL). La teneur en diacétyle la plus élevée est produite par l'association (LnL+LcD).

Selon Cogan (1975), les levains contenant *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis*, c'est ce dernier qui est généralement le plus responsable de la production d'arôme. En revanche, selon De Roissart (1986), le comportement d'une culture mixte et de *Leuconostoc lactis* est très voisin d'une culture pure de *Lactococcus lactis ssp diacetylactis*.

On remarque que l'association (LnL+LcD) a obtenu une teneur de diacétyle de 0,80 ppm, qui n'est pas très loin de celle obtenue par la culture pure de *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (0,87 ppm).

Les cultures mixtes constituées de *Leuconostoc lactis* sont rarement utilisées en industrie laitière, car la production de diacétyle est le caractère le plus utilisé des *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (Cogan, 1975).

Notre interprétation sera principalement axée sur les associations de *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* aux différentes espèces de Lactocoques.

En observant les figures 42, 43 et 44, on constate deux phases successives, une phase ascendante où la teneur en diacétyle augmente jusqu'à atteindre son maximum à 16 heures d'incubation, suivie d'une deuxième phase d'allure descendante au-delà de 16 heures.

L'explication que nous pouvons donner à travers les résultats obtenus concernant les cultures mixtes (LnC+LcL) et (LnC+LcC), est basée sur les propriétés de certaines souches que nous avons utilisées.

Selon Schmidt et al (1994), la formation de diacétyle à partir des citrates par *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* est favorisée en milieu acide, et la présence d'un Lactocoque, *Lactococcus lactis ssp lactis* ou *Lactococcus lactis ssp cremoris* permet de créer rapidement les conditions optimales nécessaires. Les travaux de Lindsay et al (1965), ont montré que *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* cultivé en présence d'un Lactocoque acidifiant est stimulé dans sa croissance par la production d'acétaldéhyde des Lactocoques. Ceci explique la forte teneur en diacétyle, au cours des 16 premières heures.

Comme nous l'avons cité précédemment, la phase descendante enregistrée après 16 heures d'incubation est le résultat de 2 phénomènes produits simultanément

par l'épuisement du milieu en composés précurseurs du diacétyl et par l'action de la diacétyl réductase (Divies et al, 1994 ; Schimidt et al, 1994).

On remarque que l'association de *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* n'est pas bénéfique, on parle dans ce cas d'antagonisme qui pourrait être du⁶, soit à une compétition vis-à-vis d'un même substrat, soit à un rejet de composés toxique par l'une des souches.

Heures Rap. l/s	4h	16h	18h	24h
Rapport 1/1	0,025	0,45	0,34	0,25
Rapport 1/2	0,015	0,43	0,3	0,18
Rapport 2/1	0,035	0,35	0,23	0,15

Tableau 40. Evolution de la production de diacétyl (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnC + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	4h	16h	18	24h
Rapport 1/1	0,063	0,75	0,6	0,35
Rapport 1/2	0,045	0,6	0,4	0,37
Rapport 2/1	0,025	0,57	0,36	0,25

Tableau 41. Evolution de la production de diacétyl (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Heures Rap. l/s	4h	16h	18h	24h
Rapport 1/1	0,035	0,35	0,24	0,23
Rapport 1/2	0,025	0,33	0,21	0,19
Rapport 2/1	0,035	0,3	0,16	0,13

Tableau 42. Evolution de la production de diacétyl (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

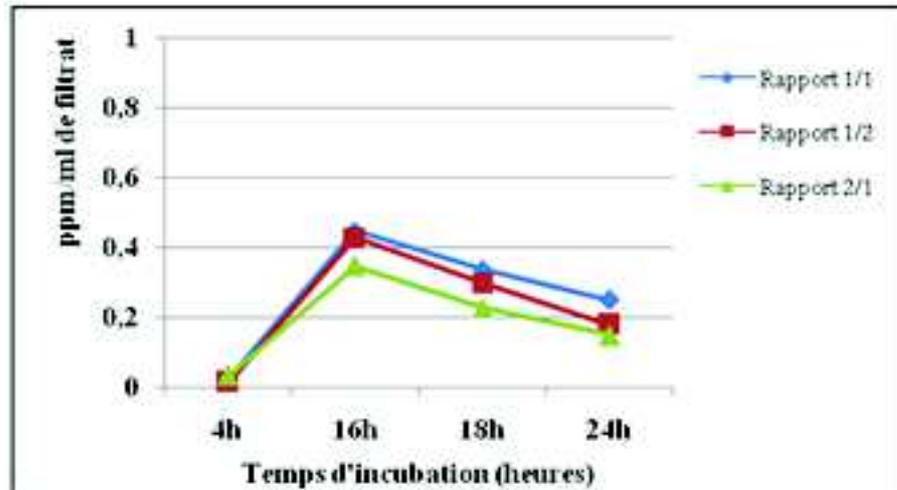


Figure 42. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (LnC + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

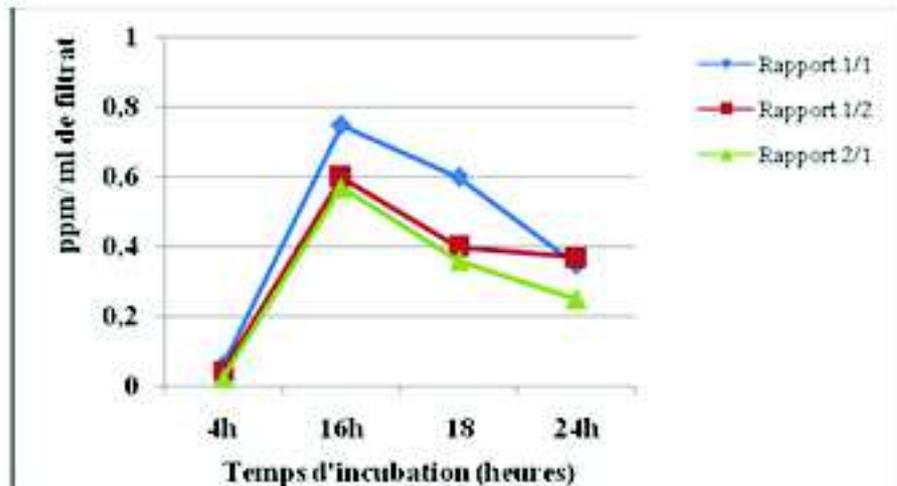


Figure 43. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (LnC + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

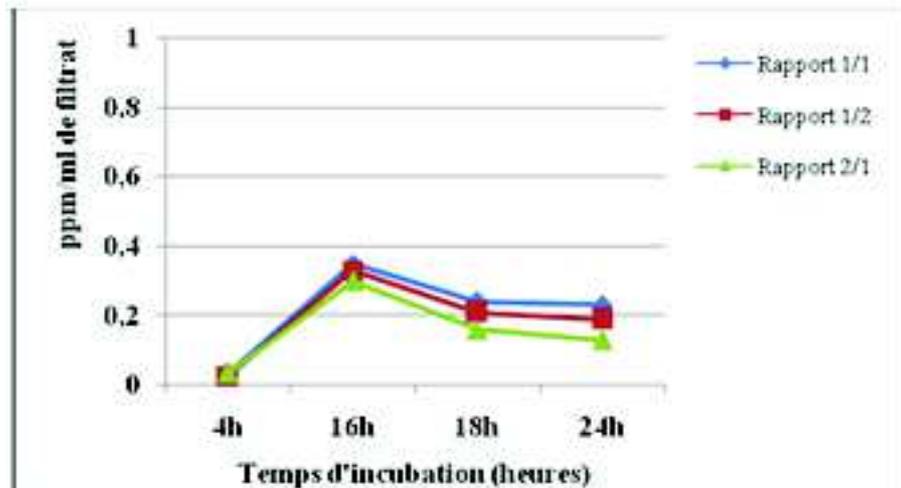


Figure 44. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnC + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Rap. l/s \ Heures	4h	16h	18h	24h
Rapport 1/1	0,015	0,08	0,05	0,03
Rapport 1/2	0,015	0,06	0,04	0,02
Rapport 2/1	0,015	0,05	0,035	0,01

Tableau 43. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Rap. l/s \ Heures	4h	16h	18h	24h
Rapport 1/1	0,03	0,13	0,1	0,045
Rapport 1/2	0,02	0,1	0,075	0,035
Rapport 2/1	0,02	0,09	0,06	0,02

Tableau 44. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

Rap. l/s \ Heures	4h	16h	18h	24h
Rapport 1/1	0,05	0,8	0,67	0,15
Rapport 1/2	0,03	0,77	0,62	0,11
Rapport 2/1	0,01	0,75	0,58	0,08

Tableau 45. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

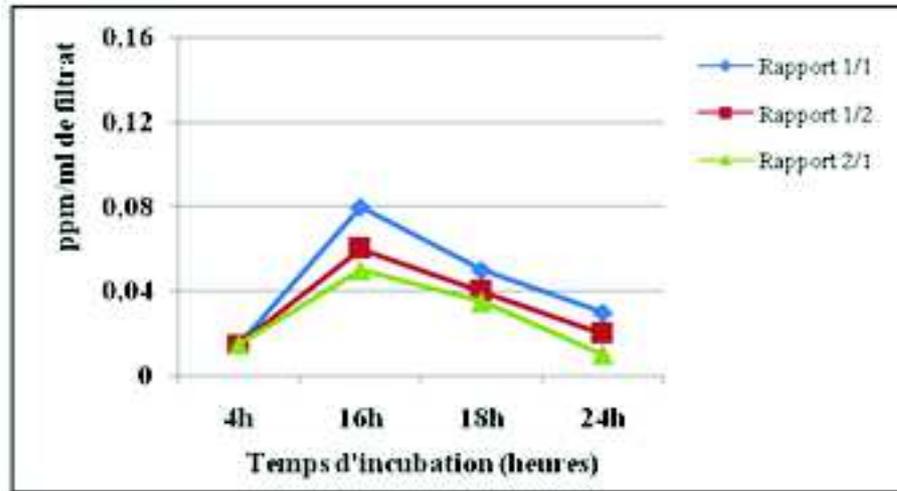


Figure 45. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp lactis* (LnL + LcL) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

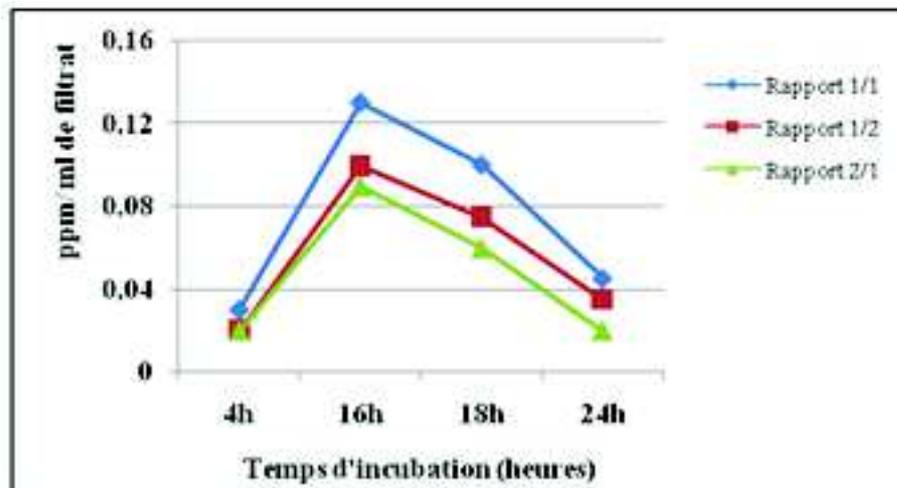


Figure 46. Evolution de la production de diacétyle (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris* (LnL + LcC) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

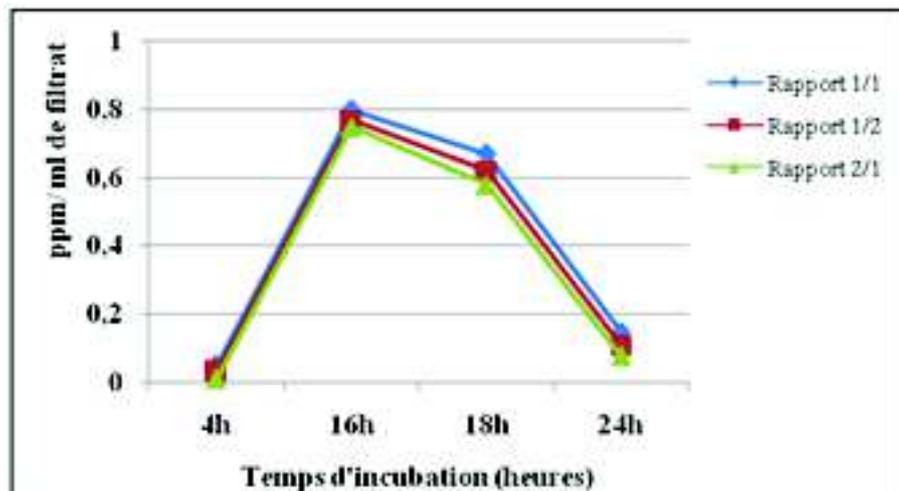


Figure 47. Evolution de la production de diacétyl (ppm/ml de filtrat) de la culture mixte *Leuconostoc lactis* et *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* (LnL + LcD) selon les rapports l/s (1/1, 1/2, 2/1) en fonction du temps d'incubation.

III. Influence du pH, taux d'ensemencement, température d'incubation sur la production du diacétyl du ferment (caillé)

III.1. Les facteurs influençant la production du diacétyl

Les souches mixtes ayant servies pour la préparation du levain lactique mésophile pour la fabrication du caillé ont été cultivées dans les conditions choisies, expérimentales, dépendantes du :

- pH.
- Taux d'ensemencement.
- Température d'incubation.

L'évolution du pH, est particulièrement intéressante et importante à connaître, car la production de diacétyl en dépend. Cependant, deux pH nous ont paru déterminants en fonction du but à atteindre : pH 6 et pH 4,30.

En effet, il a été montré dans des études scientifiques bibliographiques, que l'initiation de la synthèse du diacétyl n'a lieu que lorsque le pH est inférieur à 6, car la transformation des citrates ne se produit qu'au dessous de ce pH. Certains travaux ont abouti à la conclusion que le maximum de production de diacétyl correspond à un pH voisin de 4,30 (Lacrampe et Weber, 1984).

Le taux d'ensemencement joue un grand rôle au point de vue vitesse d'acidification et baisse de pH, comme l'a montré l'examen de la figure 49.

En comparant les résultats obtenus avec le levain expérimental préparé avec un taux d'ensemencement de $(2 \cdot 10^{-4})$ contre le levain témoin, il s'avère que la vitesse d'acidification

est supérieure à celle du témoin (tableau 47). On note également, que le pH (4,35) est obtenu 2h à 2h30 plus tôt que pour le témoin.

III.2. Production de diacétyle au cours de l'incubation

Outre la production d'acide lactique que nous venons de considérer, nous nous sommes intéressés particulièrement à celle de diacétyle dans le levain du (caillé).

Notre but a donc été d'essayer de concilier, les impératifs d'acidification du milieu et la production optimum de diacétyle. Il se trouve que les deux phénomènes semblent liés et évoluer dans le même sens. Un paramètre important agit cependant sur ces deux productions : il s'agit de la température d'incubation des levains.

A travers les résultats précédents concernant l'acidification et l'évolution du pH (figures 48 et 49), nous avons choisi de suivre la production de diacétyle au cours de la période d'incubation à deux températures différentes (21°C et 25°C) pour un même taux d'ensemencement en comparaison avec le levain témoin. Les résultats correspondants au dosage de ce composé aromatique au cours du temps d'incubation sont illustrés dans la figure 50.

Taux d'ens \ Heures	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Taux d'ens (2.10 ⁻⁴)	6,6	6,6	6,5	6,4	6,1	5,63	5,14	4,7	4,5	4,4	4,35
Témoin taux d'ens (1,5.10 ⁻²)	6,7	6,7	6,65	6,55	6,3	5,8	5,3	4,8	4,57	4,46	4,4

Tableau 46. Variation du pH du ferment (caillé) en fonction du temps d'incubation (21°C).

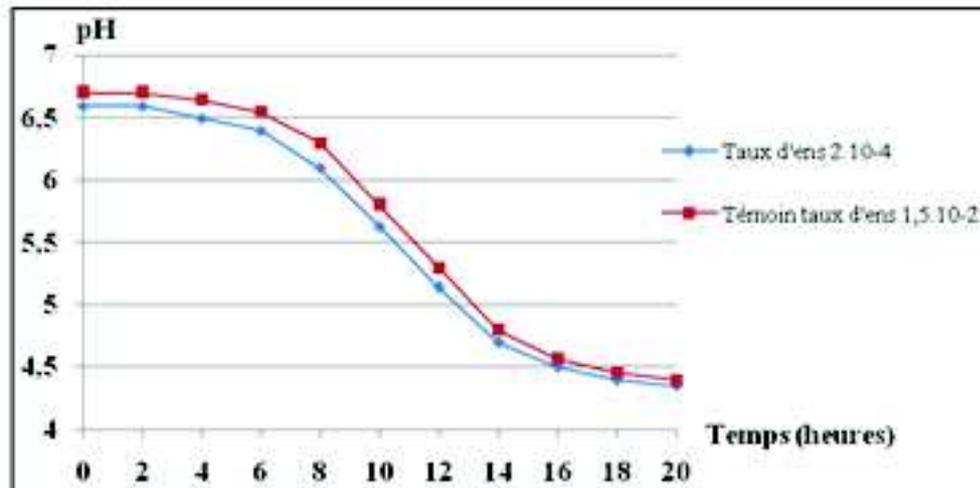


Figure 48. Variation du pH du ferment (caillé) en fonction du temps d'incubation (21°C).

Taux d'ens \ Heures	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Taux d'ens (2.10 ⁻⁴)	16	16	16,3	16,9	17,4	18,2	19,8	21	23,6	30	40	60	73	81,2	83	83	83
Témoin taux d'ens (1,5.10 ⁻²)	16	16	16,2	16,5	17	17,5	18,2	19	21,2	24	30	37	50	66	72	76	77

Tableau 47. Variation de l'acidité du ferment (caillé) en fonction du temps d'incubation (21°C).

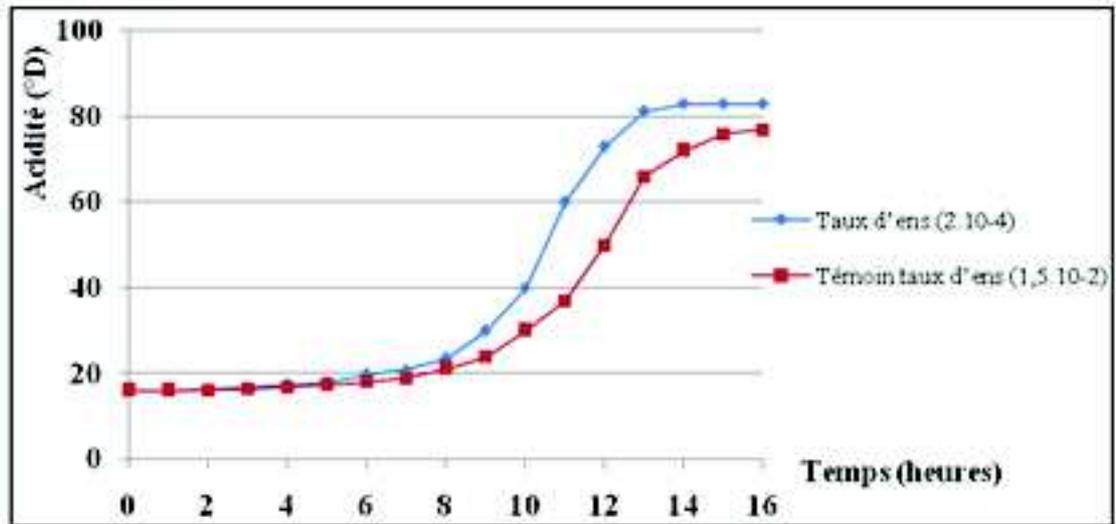


Figure 49. Evolution de l'acidité du ferment (caillé) au cours de l'incubation (21°C).

Temps (heures)	Ferment (caillé) 2.10 ⁻⁴		Témoins 1,5.10 ⁻²
	21°C	25°C	21°C
8	0,2	0,405	0,2
10	0,525	0,625	0,4
12	0,725	1,575	0,55
14	1,45	1,727	1,05
16	2,07	2,365	1,6
18	3	2,67	1,8
20	3,425	2,76	2,05
22	3,75	2,4	2,1
24	3,225	2,1	2,2
26	2,4	1,4	1,8
28	1,9	0,89	1,1
30	1,5	0,575	0,6

Tableau 48. Variation de la teneur en diacétyle (ppm) du ferment (caillé) au cours de l'incubation.

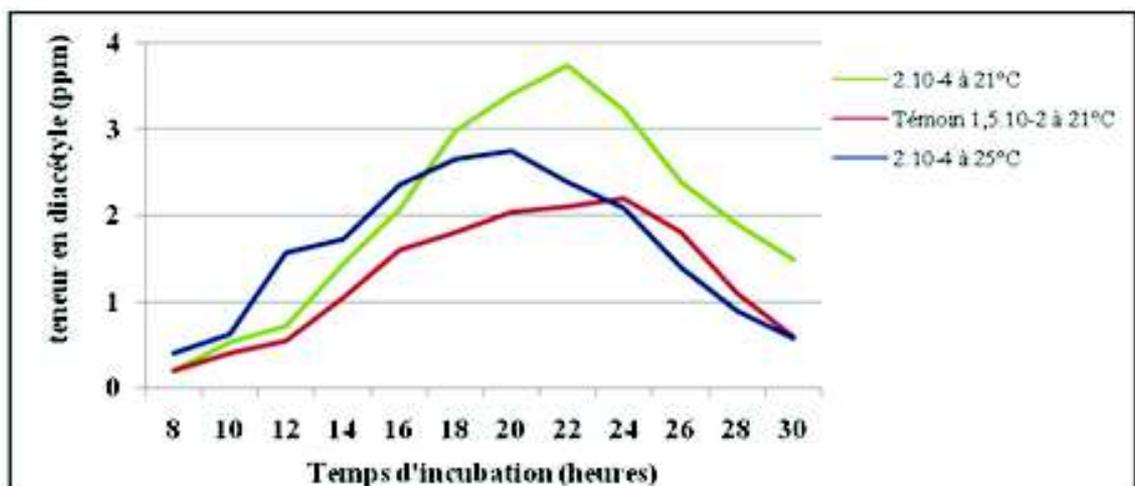


Figure 50. Variation de la teneur en diacétyle (ppm) du ferment (caillé) au cours de l'incubation.

Nous remarquons que l'ensemble des résultats mentionnés dans le tableau 48, indiquent que l'optimum de production semble se situer aux environs de 22h à 24h d'incubation ; et que l'initiation de la production de diacétyle a lieu plus tôt lorsque la température d'incubation est de 25°C.

Nous constatons également que les valeurs des teneurs maxima en diacétyle sont atteintes plus rapidement à 25°C qu'à 21°C.

Dans le cas de l'ensemencement initial de $2 \cdot 10^{-4}$, nous avons enregistré un optimum de production qui est de (3,75) au bout de 22 h à 21° C et de (2,76) au bout de 20 h seulement à 25°C. Dans les deux cas on remarque que les meilleurs résultats sont obtenus à 21°C.

IV. Etude de la qualité physico-chimique du lait caillé expérimental

IV.1. Mesure du pH ou acidité actuelle

L'étude a porté sur le lait caillé expérimental. Les analyses effectués sur la mesure du pH ont donné des valeurs en trois essais variant de 4,1 ; 4,4 à 4,6 avec un pH moyen de 4,36 comparativement au pH du lait caillé industriel qui est bas et variable (3,96 à 4,9) avec une moyenne de 4,27.

D'après Rasic et Kurmann (1978), le pH qui permet l'obtention d'une structure normale du caillé sans séparation du petit lait se situe entre pH (4 et 4,6), ce qui se rapproche de nos résultats. La baisse du pH trouve son explication dans l'utilisation du lactose par les ferments lactiques.

Cela traduit une relative maîtrise des procédés de fabrication de laits caillés industriels. Néanmoins d'un type de lait à l'autre, il peut apparaître des variations imputables à l'absence d'uniformisation des méthodes de préparation. Au sein d'un même type de lait, la raison peut être une irrégularité et une inconstance dans les procédés de fabrication dans les industries laitières.

VI.2. Acidité de titration en °D

L'acidité Dornic du lait caillé expérimental mesurée en trois essais, varie de 75°D, 84°D à 90°D, d'où une acidité moyenne de 83°D. Cependant, on note que les valeurs obtenues sont logiques si l'on sait que dans ces produits, le processus d'acidification est stoppé par le refroidissement. Ces résultats se rapprochent de ceux de Brunet (1991) pour le yaourt (80°D - 120°D) au bout de 24 jours, exigence à laquelle répondent les laits caillés industriels analysés et dont les procédés de fabrication sont comparables à ceux des yaourts brassés.

Comparativement aux laits caillés industriels, l'acidité dornic est également très variable, allant de 70°D à 127,5°D, avec une moyenne de 89,4°D. Ces résultats sont globalement satisfaisants.

Conclusion

L'objectif de la présente étude a consisté en un isolement et une caractérisation de souches locales de bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle) ayant un intérêt en technologie fromagère.

L'isolement a été effectué à partir de différents sites lactiques présentant des caractéristiques diverses permettant ainsi d'obtenir un nombre relativement élevé de souches lactiques recherchées. Pour cela, nous avons utilisé les techniques classiques et les milieux de sélection adéquats.

Vingt cinq (25) isolats de la flore microbienne analysée, ont été identifiés à partir des échantillons de lait de vache, sous ses deux formes (cru et caillé), et du leben artisanal.

Les isolats sont représentatifs de la flore dominante, il s'agit des Lactobacilles, Pediocoques, Streptocoques, Lactocoques mésophiles, Leuconostocs et Entérocoques.

L'étude cinétique des différents souches sélectionnées et après identification nous a permis de retenir trois (03) souches de Lactococcus (dont deux acidifiantes et une aromatisantes) associées à une souche de Leuconostoc aromatisante.

L'étude des aptitudes technologiques des souches isolées en culture pure et mixte (binaire), nous a permis de sélectionner, les plus performantes pour la production d'acide lactique et de diacétyle (arôme caractéristique de beurre recherché dans l'élaboration de produits laitiers).

Deux (02) souches acidifiantes de Lactococcus (Lc. Lactis et Lc. Cremoris) avec une souche aromatisante (Lc. Diacetylactis) ont été retenues pour être associées avec une souche aromatisante de Leuconostoc (Ln. Cremoris) pour la mise au point d'un ferment lactique local ayant des propriétés aromatisantes recherchées.

Les résultats relatifs à la production d'acide lactique en culture pure ou mixte montrent que l'optimum de production est obtenu pour un rapport d'ensemencement L/S=1/1 pour les cultures pures d'une part; et d'autre part, l'activité acidifiante et aromatique des associations (en culture mixte) a été obtenue également avec un rapport d'ensemencement enregistré L/S = 1/1.

Il faut indiquer, par ailleurs, que les souches lactiques mésophiles testées semblent intéressantes bien que leurs pouvoirs acidifiant et aromatisant soient inférieurs à ceux des souches de référence.

Par ailleurs, l'analyse de l'effet de la variation de la température d'incubation sur la production du diacétyle du ferment local, indique qu'à une température de 21°C, l'optimum de cette production est atteint après un temps d'incubation compris entre 22h et 24h.

En revanche, l'initiation de cette production a lieu, et plus rapidement à température d'incubation de 25°C. En ce qui concerne le taux de diacétyle produit, l'optimum est obtenu à une température de 21°C. Pour des températures plus élevées le taux de diacétyle est inférieur pour un même taux d'ensemencement.

L'aptitude technologique des ferments obtenus avec les souches sélectionnées est évaluée, comparativement aux ferments de référence, par l'élaboration d'un caillé fabriqué

selon le modèle mis au point (traditionnel). Les résultats obtenus indiquent que le caillé présente une structure normale sans séparation du petit lait et ayant un pH de l'ordre de 4,36 et une acidité moyenne de 83°. Il se rapproche du Yaourt commercialisé dont l'acidité varie entre 80°-120° (en 24h) ces caractéristiques correspondent à celles des laits caillés industriels.

Sans préjuger des résultats obtenus, les souches locales isolées peuvent servir pour la mise au point de ferments lactiques recherchés par l'industrie laitière.

En perspective, il est intéressant de poursuivre l'étude en examinant d'autres aspects à savoir :

- Recherche de nouvelles souches (autres genres) acidifiantes et aromatisantes isolées à partir d'autres sites.
- Etudier la possibilité d'association d'autres souches (Lactocoques et Leuconostoc, Baccillus probiotique ...), déterminer leur efficacité technologique (qualité des produits élaborés). Optimiser les conditions de culture pour des meilleurs rendements en biomasse.
- Utilisation de ces ferments dans les laits d'hiver pauvres en flore indigène et pour renforcer son aptitude technologique.
- Etudier les possibilités d'obtention de ces ferments lactiques locaux à l'échelle industrielles et déterminer les caractéristiques sensorielles et rhéologiques des produits élaborés.

REFERENCES

- Aarnikunnas J, 2006.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Academic Dissertation, University of Helsinki.
- Accolas J.P ., Bloquel R ., Didienne R et Regnier J, 1977.** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. Rev, Le lait, 561-562, 1-23.
- Ahamad N et Marth E.H, 1989.** Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 degree in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *Journal of Food Protection* 52, 688-695.
- Aktypis A., Kantzopoulos G., Huis in't Veld J.H.J et Ten Brinb B., (1998).** Purification and characterization of thermo-philin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 568-576.
- Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T.R, 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 3906-3912.
- Amouzou K.S., Prevost H et Divies C, 1985.** Influence de la supplémentation du lait en magnésium sur la fermentation lactique réalisée par *Streptococcus lactis* et *streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 65, 21-34.
- Amrouche L, 2003.** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des Streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. Mémoire. Mag. ENSA, El Harrach, 109 p.
- Antinone M.J., Lawless H.T., Leaford R.A et Johnston M, 1994.** Diacetyl as a flavor component in full fat Cottage cheese. *J. Food Sci.* 59 (1): 38- 42.
- Antoine J.M., Adam F., Fazel A et Hartel Y.D, 1993.** Bactéries lactiques en alimentation humaine, bactéries lactiques 2. Ed. Loriga; 419-428.
- Archibeld F.S, 1986.** Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 13, 63-109.
- Aslim B., Yuksekdağa Z.N., Sarikayab E et Beyatli Y, 2005.** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)* 38, 691-694.
- Atlan D., Auel D et Gilbert C, 2000.** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases. *Science des aliments*, 20, (01), pp: 5-17.
- Atlan S, 2007.** Modélisation de la libération des composés d'arôme à partir de matrices alimentaires dans des systèmes expérimentaux et en : détermination des propriétés

- et bouche mécanismes de transfert de matière. Thèse doctorat. Agro Paris Tech. 202p.
- Axelsson L, 1993.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S and Von Wright A. pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
- Axelsson L, 1998.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen S et Von Wright A. (ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-72.
- Axelsson L, 2004.** Classification and physiology In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc, vol. 633, 1 - 66.
- Azari B, 1999.** Effet de la température sur la croissance bactérienne et la production de composés d'arôme dans du lait supplémenté de citrate par des bactéries lactiques mésophiles aromatisantes en culture mixte. Thèse de maîtrise. Université de Moncton. 106p.
- Baliarda A, 2003.** Évaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse doctorat. Université de Bordeaux 1. 394p.
- Baron M, 1998.** Étude de l'impact de l'ajout des bifidobactéries sur les cinétiques de fermentation des bactéries lactiques mésophiles utilisées dans la production de fromage frais. Thèse de maîtrise. Université Laval, Québec. 108p.
- Bassit N., Boquien C.Y., Picque D et Corrieu G, 1993.** Effect of Oxygen Concentration on Diacetyl and Acetoin Production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetyl lactis*. Applied and Environmental Microbiology 59(6): 1893-1897.
- Bassit N ., Latrielle E ., Bouquien C.Y ., Pique D et Corrieu G, 1994.** Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyl et d'acétoïne par *Lactococcus lactis ssp lactis* biovar *diacetylactis*. Rev, Le lait, 74, 115-126.
- Bekhouche F, 2006.** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse doctorat. Université de Constantine. 147p.
- Bellengier P., Foucaud C et Richard J, 1997.** Associative growth studies of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strain in milk. Journal of dairy. Research, 80, 1520-1527.
- Benthin S et Villadsen J, 1995.** Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by D- and L-Lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 647-654.
- Bigret M, 1989 .** Probiotics - from Empirism to Science. Biofutur, 62-64
- Blom H et Mortvedt C, 1991.** Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. Biochem Soc Trans. 19 (3): 694-698.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malmme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D et Sorokin A, 2001.** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. Genome Research 11, 731-753.

- Boquien C.Y., Corrieu G et Desmazeaud M.J, 1988.** Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2527-2531.
- Boudrier J.F, 1985.** Produit frais. In « Laites et produits laitiers vache, brebis et chèvre ». Tome 2. Edition technique et documentation Lavoisier, Paris. Pp 35-66.
- Boumerdassi H., Desmazeaud M., Monnet C. Boquien C.Y et Corrieu G, 1996.**Improvement of Diacetyl Production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 Through Oxygen Control. *Journal of Dairy Science* 79: 775-781.
- Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M et Corrieu G, 1997.**Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing par diacetyl and acetoin from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (6): 2293- 2299.
- Bourgeois C.M et Larpent J.P, 1996.**Microbiologie alimentaire. T.2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec et Doc, Lavoisier (Paris), 523 p.
- Boyaval P, 1989.** Lactic acid bacteria and metal ions. *Le Lait*, 69, 87-113.
- Brul S et Coote P, 1999.** Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1-17
- Byezkowski J et Gessner T, 1988.** Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry* 20, 569-580.
- Cachon R et Diviès C, 1993.** A descriptive model for citrate utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Biotechnology Letters* 15(8): 837-842.
- Cachon R et Diviès C, 1994.** Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41 : 694-699.
- Cachon R., Jeanson S., Aldarf M et Diviès C, 2002.**Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, 281-288.
- Canon P., Lee T., Bolanos J et Danziger L. 2005.**Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 24, 31-40.
- Caplice E et Fitzgerald G.F, 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 50 (1-2): 131-149.
- Carr F.J, Chill D et Maida N, 2002.** The lactic acid bacteria: A literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 33, 307-313.
- Chamba J.F et Prost F, 1989.** Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite. *Rev, Le lait* 669, 417-431.
- Chamba J.F., Duong C., Fazel A et Prost F, 1994.** Sélection de souches de bactéries lactiques In : *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 1* Ch.III-2 p. 499-521. éd. De Roissard H et Luquet F.M, Loriga : Uriage, France.
- Champagne C.P et Moineau S, 2003.** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière : bactériophages. Ed. Fondation des Gouverneurs. PP 89-116.

-
- Champagne C.P, 1998.** Caractéristiques des bactéries lactiques. In : Production & ferments lactiques. Champagne. C.P. (cd.). La Fondation des Gouverneurs, Ediscm, Saint Hyacinthe, Qc, Canada 1-9
- Champagne C.P., Lange M., Blais A et Goulet J, 1992.** Caractéristiques et emplois de cultures lactiques en industrie laitière. Conseil des denrées alimentaires du Québec. Québec : Ministère de l'agriculture, de pêcheries et de l'alimentation.
- Champagne C.P., Moineau S., Lange M., Gelinas P et Audet P, 2000.** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed. Fondation des Gouverneurs, 210 p.
- Chavanne M., Beaudoin G.J., Jullien A. et Flamand E, 1987.** Chimie organique expérimentale. Ed. Le Griffon d'argile, p 159-227.
- Chenoll E., Macian M.C et Aznar R. 2003.** Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. Systematic and Applied Microbiology. vol 26, 546-556.
- Cherprenet J et Cau J, 1982.** Contrôles du lait et produits laitiers. Les bactéries lactiques. Ed, CRDP Dijon, 158-170.
- Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A et Steele J.L, 1999.** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 76, p. de 217-246
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F et Chikindas M.L, 2001.** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, Int. J. Food Microbiol. 71: 1-20.
- Cocaign-Bousquet M., Even S., Lindley N.D et Loubière P, 2002.** Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis* : genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 24-32
- Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley N.D et Loubiere P, 1995.** Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Bacteriology, 79, 108-116.
- Cogan T.M et Jordan K.N, 1994.** Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. J. Dairy Sci., 77: 2704-2717.
- Cogan T.M, 1975.** Citrate utilization in milk by *Leuconostocs cremoris* and *Streptococcus diacetylactis*. Journal dairy research, 42 (1), 139-146.
- Cogan T.M, 1980.** Les levains lactiques mésophiles. Le lait, 60(597): 397-425.
- Collins E.B, 1972.** Biosynthesis of flavor compounds by micro-organisms. J. Dairy Sci., 55: 1022-1028.
- Collins M.D et Gibson G.R, 1999.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Ann. J. Clin. Nutr, 69: 12525-75.
- Collins M .D, Samelis J., Metaxopoulos J et Wallbanks S, 1993.** Taxonomic studies of some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol. vol 75, 595 - 603.
- Condon S, 1987.** Response of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbial. Rev, 46: 269-280.
-

- Coulibaly I., Yao A.A., Lognay G., Destain J., Fauconnier M.L et Thonart P, 2009.** Survival of freeze dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157: 70-84.
- Crow V.L et Pritchard G.G, 1976.** Purification and properties of pyruvate kinase from *Streptococcus lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 438, 90-101.
- Crow V.L et Pritchard G.G, 1977.** Fructose 1,6 diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*, kinetic properties and factors affecting activation. *Journal of Bacteriology*, 131 (1): 82-91.
- Curioni P.M.G et Bosset J.O, 2002.** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12:959-984.
- Daeschel M.A, 1989.** Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 43 (1), 164-167.
- Daly C., Fitzgerald G.F., O'Connor L et Davis R, 1998.** Technological and health benefits of dairy starter cultures. *International Dairy Journal* 8, 195-205.
- Daoudi A, 2006.** Qualité d'un fromage local à base de lait de chèvre. Mémoire de Magistère, Université Hassiba Ben-Bouali - Chlef. 187p.
- Davidson P.M et Hoover D.G, 1993.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria in *Lactic Acid Bacteria*. Ed. Marcel Dekker (New York), 127-159.
- De Roissard H.B, 1986.** Bactéries lactiques. In lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Tome 3. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris : 191-203.
- De Roissard H.B et Luquet M, 1994.** " Bactéries lactiques" Vol I. Ed. Loriga. 605p.
- Dellagio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C et Janssens D, 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques in *Bactéries lactiques*. T.1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga (Uriage), 25-68. 614 p.
- Dellaglio F, 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed. Loriga Lavoisier, Paris, 1-37.
- Denis Dalie D.K, 2010.** Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. Thèse doctorat. Université Bordeaux 1. 422p.
- Desmazeaud M, 1996.** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, pp: 331-343.
- Desmazeaud M.J et De Roissard H, 1994.** Métabolisme général des bactéries lactiques. *Bactéries Lactiques, aspects fondamentaux et technologiques*. Ed, Loriga-Uriage, 1, 169-207.
- Desmazeaud M.J, 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait.* (63), p. 267-316
- Desmazeaud M.J, 1994.** Le lait milieu de culture. Dans: H. De Roissard et F. M. Luquet (éds.). *Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques*, vol. 2, (pp. 25-36). Uriage, France : Loriga.

- Devoyod J.J et Poullain F, 1988.** Les Leuconostocs, propriétés : Leurs rôles en technologie laitière. Le lait 68, 249-280.
- Dilmi-Bouras A, 2002.** Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de doctorat d'état, INA, EL- Harrach, Alger.
- Divies C.F.L., Hubert J.C et De Roissart H, 1994.** Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 1 Chapitre 1-7: 2,91-307. Ed, De Roissard H. et Luquet F.M. Lorica : Uriage, France.
- Djidel A, 2007.** Production d'acide lactique par *Lactococcus casei subsp. rhamnosus* sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse doctorat. INP Lorraine. 246p.
- Dolyres Y, 2003.** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisés. Thèse de Ph. D. Université Laval (Québec), 148 p.
- Donohue D, 2004.** Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria in Lactic Acid Bacteria, 3rd rev. ed edn. New York Marcel Dekker. pp 531-546.
- Drinan D.F., Tobin S et Cogan T. M, 1976.** Citrate acid metabolism in hétero- and homofermentative lactic acid bacteria. Appl. Microbiol., 31 : 481-486.
- Edima H.C, 2007.** *Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse doctorat. INP Lorraine. 226p.
- Edwards C.G., Collins M.D., Lawson P.A., Rodriguez A.V, 2000.** *Lactobacillus nagelii* ssp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000, vol. 50, 699 - 702.
- Eom H.J., Seo D.M et Han N.S, 2007.** Selection of psychrotrophic Leuconostoc spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. International Journal of Food Microbiology. vol. 117, 61-67.
- Farrow J.A.E., Facklam R.C et Collins M.D, 1989.** Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant Leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, pp: 279-283.
- Ferreira C.L et Delf A., 1999.** Lactic cultures as dietetic aids. Dairy Science. Abstracts, 51(1): 33
- Figueiredo A.R., Campos F., De Freitas V., Hogg T., Couto J.A, 2008.** Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. Food Microbiology. vol. 25, 105-112.
- Forde A et Fitzgerald G, 2000.** Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. Current Opinion in Biotechnology 11:484-489.
- Fox P.F., Law J., McSwaney P.L.H et Wallace J., 1993.** Biochemistry of cheese ripening, Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol: 1, General Aspects. Chapman and Hall Ed, New York. PP 389-438.
- Fox P.F., Lucey J.A et Cogan T.M, 1990.** Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Food Sci. Nutrition, 29: 237- 253.

- Franz C.M.A.P, Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H, 2003.** Enterococci in foods - a conundrum or food safety. International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects. vol 88,105-122.
- Fuller R, 1991.** Probiotics in human medicine. Gut. 32: 439-442.
- Gagnon D, 2006.** Formulation et propagation de ferments lactiques mésophiles à haut caractère aromatique. Thèse de maîtrise. Université Laval, Québec. 163p.
- Garcia-Quintans N., Magni C., De Mendoza D et Lopez P, 1998.**The citrate transport system of *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. Appl. Environ. Microbiol. 64: 850-857.
- Garrity G., Brenner D., Krieg N et Staley J, 2008.**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes, Originally published by Williams and Wilkins, 1984, 2nded, Hardcover, 1450p.
- Gasson M. J., Benson K., Swindell S et Griffin H, 1996.** Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. Lait. 76:33-40.
- Gilliland S.E, 1985.** Introduction. In : Bacterial starter cultures for foods. Gilliland, S.E (ed.). CRC Press. 1-3.
- Gollop N., Zakin V et Weinberg Z.G, 2005.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. Journal of Applied Microbiology 98, 662-666.
- Gordin B.R et Gorbach S.L, 1992.** Probiotics for humans. Probiotics, the scientific basis, p 355-376. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, Londres.
- Gronlund M.M., Lehtonen O.P., Kero P., Saxelin M et Salminen S, 1997.** Lactobacillus GG supplementation does not reduce faecal colonization of *Klebsiella oxytoca* in infants. Acta Paediatrica, 86 (7): 785-786.
- Guarner F. et Schaafsma G.J, 1998.**Probiotics. International Journal of Food Microbiology 39, 237-238.
- Guiraud J.P, 1998.** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- Guiraud J.P, 2003.** Microbiologie alimentaire. Dunod – RIA. p 696.
- Hagen B.F., Næs H., Holck A.L, 2000.** Meat starters have individual requirements for Mn^{2+} . Meat Science. vol 55, 161-168.
- Hansen J.N, 1994.** Nisin as a model food preservative. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 34, 69-93.
- Harvey R.J et Collins E.B, 1962.** Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. Journal of Bacteriology. 82:954-959.
- Harvey R.J et Collins E.B, 1963.** The citratase of *Streptococcus diacetylactis*. Substrate Products and Equilibrium. J. Biol. Chem., 238, 2648-2653.
- Hassan A.I., Deschamps N et Richard J, 1989.** Mesures de vitesse de croissance des Streptococcus lactiques dans le lait basée sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Etude de référence avec *Lactococcus lactis*. Rev, Le lait, 69, 433-447.

-
- Hermier J., Levoi R.J et Weber F, 1992.** Les groupes microbiens d'intérêts laitiers. Ed Cepil. PP 42-59.
- Ho T.N.T, 2008.** Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse doctorat. Université Bordeaux 1. 201p.
- Hols P., Kleerebezem M., Schanck A.N., Ferain T., Hugenholtz J., Delcour J., De Vos W.M, 1999.** Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol.* 17: 588-592.
- Hu P., Zhou G., Xu X., Li C et 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.
- Huang L, Forsberg C.W et Gibbins L.N, 1986.** Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1230-1234.
- Hugenholtz J et Starrenburg M.J, 1992.** Diacetyl production by différent strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylactis* and *Leuconostoc spp.* *Applied Microbiology and Biotechnology* 38:17-22.
- Hugenholtz J, 1993.** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 165-178.
- Hugenholtz J., Perdon L et Abee T, 1993.** Growth and energy generation by *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4216-4222.
- Hugenholtz J., Kleerebezem M., Starrenburg M., Delcour J., De Vos W., Hols P, 2000.** *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4112-4114.
- Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M. N., Wisselink W., Ladero V., Burgess K., Van Sinderen D., Piard J.C., Eggink G., Smid E., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P et Kleerebezem M, 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 217-235.
- Hutkins R.W et Morris H.A, 1987.** Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Food and Protection*, 50, pp: 876-884.
- Jack R.W., Tagg J.R et Ray B, 1995.** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59 (2), 171-200.
- Jay J.M, 1982.** Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 525- 532.
- Jay J.M, 1986.** *Modern Food Microbiology.* Ed. III. Van Nostrand Reinhold (New York), 234 p.
- Jin L.Z., Ho Y.W. , Abdullah N et Jallalludin S, 1998.** Acid and bile tolerance of *Lactibacillus* isolated from chicken intestine. *Lettres in Applied Microbiology*, 27: 183-185.

- Joffin J.M, 2000.** Morphologie et classification de *Lactobacillus* in bactériologie systématique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 : 233-459.
- Jordan K.N et Cogan T.M, 1995.** Growth and Metabolite production by mixed-strain starter cultures. *Irish J. Agricul. Food Res.*, 34: 39-47.
- Jordan K.N., O'Donoghue M., Condon S et Cogan T.M, 1996.** Formation of diacetyl by cell-free extracts of *Leuconostoc lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 143: 291 -297
- Juillard V., Desmazeaud M.J et Spinnler H.E 1988.** Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 818-822.
- Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud et M.J et Boquien C.Y, 1987.** Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industries laitière. *Le Lait*, 67, 149-172.
- Kacem M, 2005.** Bactéries lactiques d'Algérie: Isolement, identification et caractéristiques technologiques. Bactériocines produites par *Lc. Lactis* et *Lb. plantarum*. Thèse de doctorat d'état en Biologie Moléculaire et Génétique. Université d'Oran. 276 p.
- Kamaly K et Marth M.E.H, 1989.** Enzyme Activities of Lactic Streptococci and Their Rôle in Maturation of Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science* 72:1945-1966.
- Kaneko T., Suzuki H et Takahashi T, 1987.** The Effects of métal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis* 3022. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51 (9): 2315-2320.
- Kashket E.R, 1987.** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 233-244.
- Keena n T.W., Lindsay R.C et Day E.A, 1966.** Acetaldehyde utilisation by *Leuconostoc* species. *Appl. Microbiol.*, 4 : 802.
- Kempler G.M et McKay L.L, 1979.** Characterization of plasmid desoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis ssp. diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, p. 316
- Khuntia A et Chaudhary L.C, 2002.** Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15, 188-194.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-Peril M.A et Altermann E, 2005.** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., Van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Nierop Groot M.N., Kerkhoven R., De Vries M., Ursing B., De Vos W.M et Siezen R.J, 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1990-1995.
- Knapp H.R et Melly M.A, 1986.** Bactericidal effect of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Infectious Diseases* 154, 84-94.
- Koïche M, 2011.** Effet des bactéries lactiques locales du yaourt sur l'intolérance au lactose. Thèse doctorat. ENSA, El Harrach. 111p.

-
- Konnings W.N, Poolman B., Driessen A.J.M., Smid E.J et Molenaar D, 1994.** Mécanisme de transport des nutriments dans les bactéries lactique in "Bactéries lactiques". Ed. Loriga Lavoisier. PP 198-218.
- Krieg N.R, 2001 .** Volume I: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds Garrity G., Boone D., and Castenholz W. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic nd Bacteria. Originally published by Williams and Wilkins, 1984, 2e ed, Hardcover, 721p.
- Lacrampe J.L et Weber F, 1973.** Teneur en diacétyle de levain et caillés maigres fabriqués à partir de bactéries lactiques concentrées, congelées, conservées sous azote liquide. Rev, Le lait, 528, 491-519.
- Lane C.N et Fox P.F, 1996.**Contribution of Starter and Adjunct Lactobacilli to Proteolysis in Cheddar Cheese during ripening. International Dairy Journal 6: 715-728.
- Lane C.N et Fox P.F, 1997.**Role of Starter Enzymes During Ripening of Cheddar Cheese Made from Pasteurized Milk Under Controlled Microbiological Conditions. International Dairy Journal. 7: 55-63.
- Larpent J.P, 1997.** Microbiologie alimentaire. Lavoisier - Tec et Doc. Paris, 1072.
- Law J et Haandrikman A, 1997.** Review Article: Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria. International Dairy Journal 7:1-11.
- Ledesma O.V ., De Ruiz Holdago A.P et Olivier G, 1977.** A synthetic medium for comparative studies of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 42, 123-133.
- Lee K.D ., Lo C.G., Richter R.L et Dill C.W, 1995.** Effect of milk composition on the partition coefficient of diacetyl, acetaldehyde and ethanol in acidified milk products. J. Dairy Sci, 78: 2666-2674.
- Lee S.M et Drucker D.B, 1975.** Analysis of Acetoin and Diacetyl in Bacterial Culture Supernatants by Gas-Liquid Chromatography. Journal of clinical microbiology. Vol. 2, N°. 3 , p. 162-164.
- Leroy F., De Vuyst L, 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology. vol 15, 67-78.
- Levata-Jovanovic M et Sandine W.E, 1997.**A method to use *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* to improve milk fermentations. J Dairy Sci, 80 : 11-18.
- Leveau J.Y et Bouix M, 1993.** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds.Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.
- Leveau J.Y., Bouix M et De Roissart H, 1991.** La flore lactique. In : techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Techniques et documentation, Lavoisier. Paris. PP 153-189.
- Limsowtin G.K.Y., Broome M.C et Powell I.B, 2004.**Lactic acid bacteria, taxonomy. In Encyclopedia of Dairy Sciences. Roginski H. Oxford, Elsevier, 1470-1478.
- Lindsay R.C.E., Day A et Sandine W. E, 1965.** Green flavor defect in lactic starter cultures. J. Dairy Sci. 48 : 863-869.
- Loones A, 1994.** Les laits par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Ed Larica, 2: 137- 145.
-

- Lucas S et Reyrolle J 1989.** Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre de la flore au cours de la première étape de la fabrication du levain. *Le lait*, 69(2) : 123-136.
- Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B, 2008.** Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. Vol 3.
- Lynch C.M., McSweeney P.L.H., Fox P.F., Cogan T.M et Drinan F.D, 1997.** Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77:441-459.
- Mamech-Doumandji A, 2008.** Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées localement. Thèse doctorat. ENSA, El-Harrach. 119 p.
- Marshall V.M, 1993 .** Starter cultures for milk fermentation and their characteristics *J. Soci. Dairy Technol.*, 46 (2): 49-56.
- Marty-Teyssset C ., Lolkema J.S., Schmitt P., Diviès C et Konings W.N, 1996.** The Citrate Metabolic Pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: Expression, Amino Acid Synthesis, and α -Ketocarboxylate Transport. *Journal of Bacteriology* 178 (21): 6209-6215.
- Mäyrä-Mäkinen A et Bigret M, 1998.** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen S et Von Wright A. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc, New York, 73-102.
- McSweeney P.L.H et Sousa M.J, 2000.** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80:293-324.
- Meziane M, 2008.** Production en continu de l'acide lactique et du diacétyle par *Lactococcus lactis* ssp immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe. Mémoire Magistère. Université Hassiba Ben Bouali, Chlef. 166p.
- Molskness T.A., Lee D.R., Sandine W.E et Ellike P.R, 1973.** β -D-phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Journal of Applied Microbiology*, 25, pp: 373-380.
- Monnet V et Gripon J.C, 1994.** Métabolisme azoté des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. De Roissard H et Luquet F.M, Eds, Loriga, 1, 331-347.
- Montel M.C et Beuvier K, 2003.** Bâtonnets Gram positifs non sporulant réguliers : genre *Lactobacillus*. *International Dairy Journal*, 5: 117-188.
- Muir D .D., Banks J.M et Hunter E.A, 1996.** Sensory properties of cheddar cheese: effect of starter type and adjunct. *International Dairy Journal* 6:407-423.
- Nielsen D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A .G et Arneborg N, 2008.** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science*. vol 80, 919-926.
- Novel G, 1993.** Les bactéries lactiques in " *Microbiologie industrielle*" Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau G.V et Bouix M. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.
- O'sullivan L, Ross R.P, Hill C, 2002.** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.

-
- Oberman H., Piatkiewia A et Libudzisz, Z, 1982** . Production of dactyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Nahrung*, 26: 615-623.
- Olson, N. F, 1990**. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *Fed. Europ. Microbiol. Soci. Microbiol. Rev.*, 87: 131-148
- Orla-Jensen S , 1919**. The lactic acid bacteria. Copenhagen I, Kommission.
- Oscar A., Anunziata., Liliana B., Pierella., Costa M.G et Beltramone A.R, 2001**. Studies on the synthesis of diacetyl over oxidation zeolite catalysts. Centro de Investigacion y Tecnologia Quimica, Facultad Cordoba, Universidad Tecnologica Nacional, CC36, Suc 16 (5016), Cordoba, Argentina.
- Ott A, 1999**. Investigation of the aroma compounds in yogurt and their formation. Thèse de doctorat. École polytechnique fédérale de Lausanne. Université de Zurich.
- Ouadghiri M, 2009**. Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse doctorat. Université Mohamed V-Agdal, Rabat. 132p.
- Pack M.Y., Vedamuthu E.R., Sandine W.E., Elliker P.R et Leesment H, 1968**. Effect of par temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single and mixed strain lactic culture. *J. Dairy Sci.*, 51, p. 339-344.
- Paquot M., Eustache J.M., Roblain D et Thonart P.H, 1994**. Crèmes et beurres acides. Dans: De Roissart H et Luquet F.M (éds.) *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*. Vol. 2, (pp. 155-167). Uriage : Loriga.
- Patrignani F., Lanciotti R., Mathara J.M., Guerzoni M.E et Holzapfel W.H, 2006**. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks, *Int. J. Food Microbiol.* 107: 1 11
- Payne J.W, 1980**. In: *Microorganisms and Nitrogen Sources*. Ed, J.P Payne ; Johi Wiley and Sons Ltd, 211.
- Pfeiler E.A et Klaenhammer T.R, 2007**. The genomics of lactic acid bacteria, *Trends Microbiol.* 12: 546-553.
- Phalip V., Monnet C, Schmitt P., Renault P., Godon J.J et Diviès C, 1994**. Purification and properties of the #-acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis subsp. Lactis* *FEBS Letters*. 351: 95-99.
- Piard J.C et Desmazeaud M, 1991**. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71, 525-541.
- Poolman B ., Smid E.J., Velkamp H et Knings W.N, 1987**. Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, 169, 1460-1468.
- Postma P.W., Lengeler J.W et Jacobson G.R, 1993**. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- Pridmore R.D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., Barretto C., Pittet A.C., Zwahlen M.C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T., Arigoni F., Schell M.A, 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal
-

- bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 2512-2517.
- Prioult G, 1999.** Développement d'une méthode en immunofluorescence pour la détection et la quantification de *Bifidobacterium longum* et *Lactococcus lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis* coimmobilisés dans des billes de gel. Mém maître ès Sciences. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec. 92 p.
- Quadri I.E.N., Sailers M., Roy K.L., Vederas J.C et Stiles M.E, 1994.** Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biology and Chemistry* 269, 12204-12211.
- Rao D.R et Reddy J.C, 1984.** Effect of lactic fermentation on milk lipids. *Journal of Food Science* 49, 748-750.
- Raynaud S, 2006.** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse doctorat. INSA, Toulouse. 310p.
- Reiter B et Harnulv B.G, 1984.** Lactoperoxydase antibacterial systems: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection* 47, 724-732.
- Reiter B et Moller-Madsen A, 1963.** Reviews of the progress of dairy science. Section B Cheese and butter starters. *Journal of Dairy Research*, 30, 419-449.
- Richard H, 1992.** Connaissance de la nature des arômes. Les arômes alimentaires. H. Richard and J.L. Multon. Paris, Technique et Documentation, Lavoisier : 134-145.
- Rodas A.M., Ferrer S et Pardo I, 2005.** Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains, taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol.* vol. 55, 197-207.
- Rodgers S , 2001.** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures. *Trends in Foods Science and technology.* 12-276-284.
- Roginski H, 1988.** Dairy. *Ind.Int*, 53, p15.
- Romeo y, Bouvier J et Gutierre Z, 2001.** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *lactococcus lactis* et *lactobacillus plantum*. *Lait.* 81, 49-55.
- Rondags E., Germain P et Marc I, 1998.** Cinétiques de décarboxylation oxydative extra- et intracellulaire d'acétolactate par un *Lactococcus lactis ssp. lactis var. diacetylactis*. *Lait* 78, 135-143. © InraE1sevier, Paris
- Rothschild P, 1995.** Internal defenses. *Dairy Industrial International* 2, 24-25.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J et Mattila-Sandholm T, 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Sachindra N.M., Sakhare P.Z., Yashoda K.P et Narasimha Rao D, 2005.** Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control.* vol 16, 31-35.
- Saïdi N, 1998.** Bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse de Magister. Université d'Oran.
- Salawu M.B., Warren E.H et Adesogan A.T, 2001.** Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages

- treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1263-1268.
- Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L et Benno Y, 2004.** Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In *Lactic Acid bacteria: Microbiological and functional Aspects*. Eds salimen, S., von Wright, A. and Ouwervhand A., New York Dekker M. pp 515-530
- Samelis J., Rementzis J., Tsalalidou E et Metaxopoulos J, 1998.** Usefulness of rapid GC analysis of cellular fatty acids for distinguishing *Weissella viridescens*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* and some non-identifiable, arginine *Weissella* strains of meat origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 260-265.
- Sandine W.E, 1985 .** The streptococci: milk products. In: *Bacterial Starter Cultures for foods*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2-23.
- Sandine W.E, 1988.** New nomenclature of the rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 : 519-522.
- Sandine W.E., Elliker P.R et Hays H.R, 1962.** Cultural studies on *Streptococcus diacetylactis* and other members of lactic *Streptococcus* group. *Can.J.Microbiol*, 8, 161-174.
- Saxelin M., Salminen S et Isolauri E, 1998.** Chimerical efficacy of a human *Lactobacillus* strain as a probiotic. In: *Functional Foods. The Consumer, the products and the evidence*, Ed.M.J Sadler and M.saltmarsh, Royal Soc. Chemistry, Cambridge, 23-29.
- Scardovi V, 1986.** Genus bifidobacterium. Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Williams et Wilkins, Baltimore, 2, pp: 1418-1434.
- Schaafsma G et Steijns J.M, 2000.** Dairy ingredients as a source of functional foods. In Schmidle, M.K. and Labuza, T.P. (Eds.), *Essentials of functional foods* (pp. 181 204). Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers Inc.
- Schleifer K et Ludwig W, 1995.** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, pp: 461-467.
- Schleifer K.H, 1986 .** Gram-positive cocci. Dans: *bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams et Wilkins, Baltimore, 2, pp: 999-1002.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D et Fischer W, 1985.** Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Appl.Microbiology*, 6, pp: 183-195.
- Schmidt J.L., Tourneur C et Lenoir J, 1994.** Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologie laitière, in « bactéries lactiques ». Vol 1, Ed Coord. Loriga : 231-240.
- Schmitt P., Couvreur C., Cavin, J.F., Prévost H et Diviès C, 1988.** Citrate utilisation by free and immobilised *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 430-436.
- Seifu E, Buys E.M, Donkin E.F et Petzer I.M, 2004.** Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African indigenous goat milk. *Food control* 15, 447-452.

- Seitz E.W, 1990.** Microbial and enzyme-induced flavon in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 73: 3664-3691.
- Sekin K., Watanabesekine E., Toida T et Kasashima T, 1994.** Adjuvant activity of the cell Wall of *Bifidobacterium infantis* for in vivo immune response in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 16: 589-609.
- Sergent N, 1998.** Parfums et Arômes : Industrie et Synthèse. Rapport de Projet Dunkerque.
- Shahbal S., Hemme D et Desmazeaud M.J, 1991.** High cell-wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Le Lait*, 71, 351-357.
- Singer S.J et Nicholson G.L, 1972.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Singh T. K., Drake M.A et Cadwallader K.R, 2003.** Flavor of Cheddar Cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2:139-162.
- Skinell F.A et Quesnel L.B, 1978.** Streptococci. Symposium N° 7. The Society for Applied Bacteriology, Academic Press. London.
- Smith J.L et Palumbo S.A, 1983.** Use of starter cultures in meat. *Journal of Food Protection* 46, 997-1006.
- Smith M. R., Hugenholtz J., Mikoczi P., De Ree E., Bunch A.W et De Bont J.A.M, 1992.** The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Letters*. 96: 7-12.
- Somkuti G.A et Steinberg D.H, 1979.** Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose, glucose and galactose. *Journal of Food and Protection*, 11, pp: 885-887.
- Sondergaard A.K, 2005.** Application of probiotics in food. In Luquet F.M et Corrieu G. (ed.). *Bactéries lactiques et probiotiques*. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 195-209.
- Speckman R.A et Collins E.B, 1968.** Separation of diacetyl, acetoin and 2, 3-butylene glycol by salting-out chromatography. *Anal. Biochem.* 22, p.154-160.
- Stackebrandt E et Teuber M, 1988.** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, pp: 317-324.
- Stackebrandt E., Fowler V.J et Woese C.R, 1983.** A phylogenetic analysis of Lactobacilli. *Pediococcus pentosaeus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, pp: 326-337.
- Stanton C., Ga Gardiner., Lynch P.B., Collins K, Go Fitzgerald, et Ross R.P, 1998. Probiotic cheese. *Int. Dairy Journal*. 8: 491-496.
- Starrenburg M.J.C et Hugenholtz J, 1991.** Citrate fermentation by *Lactococcus* and *leuconostoc* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (1 2): 3535-3540.
- Stiles M.E et Holzappel W.H, 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-29.
- Stiles M.E, 1996.** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw*. 70: 331-340.

- Streit F, 2008.** Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1. Thèse doctorat. Agro Paris Tech. 226p.
- Ström K., Schnurer J et Melin P, 2005.** Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MILAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters* 246, 119-124.
- Swindell S.R., Benson K. H., Griffin H.G., Renauld P., Ehrlich S.D et Gason M.J, 1996.** Genetic manipulation of the Patway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental Microbiology*. 62(7): 2641-2643.
- Taillez P, 2001.** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81, 1-11.
- Talarico T.L et Dobrogosz W.J, 1989.** Chemical characterisation of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 674-679.
- Talon R et Montel M.C, 1994.** Activités estérasiques et lipolytiques des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 1 Chapitre I-10 :349-352. Éd. de Roissard H. et Luquet F. M. Loriga : Uriage, France.
- Tapernoux A, 1932.** Le diacétyle, parfum du beurre et de la margarine. *Lait* (120).
- Terzaghi B.E et Sandine W.E, 1974.** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 29, pp: 807-813.
- Teuber M., Wood B.J.B et Holzappel W.H, 1995.** The genus *Lactococcus*, In *The genera of lactic acid bacteria*. 420, 173 - 234.
- Thivierge N, 1999.** Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* pour le développement de ferments mésophiles à aptitudes fromagères élevées (Cheddar). Thèse maîtrise. Université Laval, Québec. 85p.
- Thomas T.D et Pritchard G.G, 1987.** Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Review*, 46, 245-268.
- Thomas T.D, 1976.** Regulation of lactose metabolism in group N streptococci. *Applied and Environment Microbiology*, 32, 474-478.
- Thompson J et Gentry-Weeks C.R, 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Volume 1 Chapitre I-6 :239-290. Éd. de Roissard H. et Luquet F. M. Loriga : Uriage, France.
- Thompson J, 1979 .** Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *Journal of Bacteriology*, 140, pp : 774-785.
- Thompson J.T et Thomas D, 1977.** Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source (s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 130, 583-595.
- Tofte-Jespersen N.J, 1974.** Recent developments in dairy starter cultures. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, 6, 63-68.
- Touré R., Kheadr E., Lacroix C., Moroni O et Fliss I, 2003.** Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1058 1069.

- Tsai S.P., Coleman R.D., Moon S.H., Schneider K.A et Sanville Millard C, 1993.** Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. Appl. Biochem. Biotechnol, 39 (40): 323-335.
- Tuli A., Sethi R.P., Khanna P.K et Marwaha S.S, 1985.** Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. Enzyme Microbial and Technology, 7, 164-168.
- Vedamuthu E.R, 1988.** Engineering flavor into fermented foods. Erickson, L.E. et Fung, D.Y.C. Handbook of anaerobic fermentations. New York, NY: Marcel Dekker ; p. 664.
- Verhue W.M et Tjan F.S.B, 1991.** Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of ¹³C Nuclear Magnetic resonance. Applied and Environmental Microbiology. 57(11): 3371-3377.
- Vermeiren L., Devlieghere F et Debevere J, 2004.** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. International Journal of Food Microbiology 96, 149-164.
- Vinderola C.G, Costa G.A, Regenhardt S et Reinheimer J.A, 2002.** Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 12, 579-589.
- Walsh B et Cogan T.M, 1973.** Diacetyl, acetoin and acetaldehyde production by mixed-species lactic starter cultures. Appl. Microbiol., 26, 820-825.
- Walsh B et Cogan T.M, 1974.** Diacétyl, acétoine and acetaldehyde production by mixed-species lactic starter cultures. Appl Microbiol, 26, 820-825.
- Wang L.L et Johanson E.A, 1992.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. Applied and environmental Microbiology 58 (2), 624-629.
- Wee Y.J., Kim J.N et Ryu H.W, 2006.** Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology and Biotechnology, 44 (2): 163-172.
- Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y et Gamburg M, 2004.** Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. Applied Biochemistry and Biotechnology 118, 1-9.
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J et Smit G, 2002.** Microbes from raw milk for fermented dairy products. Int. Dairy J. 12: 91 109.
- Yang D et Woese C.R, 1989.** Phylogenetic structure of the Leuconostocs: an interesting case of rapidly evolving organism. Systematic and Applied Microbiology, 12. pp 145-149.
- Yang Z, 2000.** Antimicrobial compounds and extracellular Polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Academic Dissertation. Department of Food Technology. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, 61 p.
- Yao A, 2009.** La fermentation du manioc en gari dans l'Afrique de l'Ouest : production d'un starter de bactéries lactiques lyophilisées. Thèse doctorat. Université de Liège. 215p.
- Yeagle P, 1993.** Functions of cell membrane. The membranes of cells. Yeagle P. (2nd ed). London, Academic Limited Press: 3-11.

Yoo I.K., Chang H.N., Lee E.G., Chang Y.K et Moon S.H, 1996. Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 6, 482-486.

Yvon M et Rijnen L, 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal 11:185-201.

Zadi-Karam H, 1998. Bactéries lactiques de lait de Camelus dromadarius : Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques. Elaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de diplôme de Doctorat d'Etat Université de Constantine. 189 p.

Annexes

Heures Souches	0h	2h	4h	6h	8h	24h
LcL*	18	18	35	48	67	81
LcL1	19	19	33	42	46	55
LcL2	17	17	26	35	41	47
LcL3	18	18	30	43	52	72
Moyenne	18	18	30	40	46	58

Tableau 16. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis ssp lactis* en fonction du temps d'incubation

Heures Souches	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
LcL*	6,5	6,5	6,5	6,3	5,9	5,5	5,4	5,1	4,8	4,5
LcL1	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	6	5,8	5,6	5	4,8
LcL2	6,5	6,6	6,5	6,3	6	5,6	5,4	5,3	5,1	4,9
LcL3	6,6	6,5	6,5	6,4	6,1	5,8	5,7	5,6	5,4	4,8
Moyenne	6,53	6,53	6,50	6,37	6,10	5,80	5,63	5,50	5,17	4,83

Tableau 17. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp lactis* en fonction du temps d'incubation

Heures Souches	0h	2h	4h	6h	8h	24h
LcC*	18	18	29	43	56	61
LcC1	19	19	28,5	42	52	56
LcC2	18	18	30	41	45	49
LcC3	17	17	28,5	43	50	51
Moyenne	18	18	29	42	49	52

Tableau 18. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis ssp cremoris* en fonction du temps d'incubation

Heures Souches	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
LcC*	6,5	6,5	6,5	6,4	6,1	5,6	5,5	5,3	5,2	4,9
LcC1	6,5	6,5	6,5	6,3	6,1	5,6	5,5	5,3	5,1	4,9
LcC2	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	5,7	5,6	5,4	5,2	5
LcC3	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	5,9	5,7	5,5	5,3	5
Moyenne	6,50	6,50	6,50	6,37	6,17	5,73	5,60	5,40	5,20	4,97

Tableau 19. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp cremoris* en fonction du temps d'incubation

Heures Souches	0h	2h	4h	6h	8h	24h
LcD*	18	18	30	38	46	58
LcD1	17	17	26	31,5	38	43
LcD2	18	18	28	38,5	40	48
Moyenne	17,5	17,5	27	35	39	46

Tableau 20. Evolution de l'acidité dornic chez les *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* en fonction du temps d'incubation

Heures Souches	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
LcD*	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	5,8	5,6	5,5	5,4	5
LcD1	6,5	6,5	6,4	6,3	6	5,8	5,6	5,4	5,2	4,93
LcD2	6,5	6,5	6,5	6,3	6,1	5,9	5,7	5,31	4,93	4,55
Moyenne	6,50	6,50	6,45	6,30	6,05	5,85	5,65	5,36	5,07	4,74

Tableau 21. Evolution du pH chez les *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* en fonction du temps d'incubation

Souches \ Heures	0h	2h	4h	6h	8h	24h
LnL	18	18	28	40	47	60
LnC1	19	19	27	40	48	50
LnC2	18	18	26	34	37	44
LnC3	18	18	27	36	35	42
Moyenne	18,33	18,33	26,67	36,67	40,00	45,33

Tableau 22. Evolution de l'acidité dornic chez les *Leuconostocs* en fonction du temps d'incubation

Souches \ Heures	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	24h
LnL	6,5	6,5	6,5	6,3	6	5,9	5,5	5,3	5,2	5
LnC1	6,5	6,5	6,5	6,5	6,3	6,1	5,9	5,8	5,7	5,6
LnC2	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	6,1	5,9	5,7	5,6	5,4
LnC3	6,5	6,5	6,5	6,5	6,3	6,1	5,9	5,8	5,7	5,5
Moyenne	6,50	6,50	6,50	6,45	6,25	6,10	5,90	5,75	5,65	5,47

Tableau 23. Evolution du pH chez les *Leuconostocs* en fonction du temps d'incubation

Souches \ Heures	4h	16h	18h	24h
LcL*	0,03	0,05	0,04	0,02
LcL1	0,018	0,055	0,035	0,011
LcL2	0,023	0,045	0,03	0,015
LcL3	0,02	0,05	0,04	0,015
Moyenne	0,020	0,050	0,035	0,014

Tableau 24. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis ssp lactis*

Souches \ Heures	4h	16h	18h	24h
LcC*	0,035	0,08	0,065	0,05
LcC1	0,03	0,075	0,061	0,045
LcC2	0,015	0,065	0,06	0,03
LcC3	0,02	0,06	0,035	0,025
Moyenne	0,022	0,067	0,052	0,033

Tableau 25. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*

Souches \ Heures	4h	16h	18h	24h
LcD ⁺	0,06	0,9	0,7	0,6
LcD1	0,07	0,87	0,73	0,45
LcD2	0,06	0,79	0,72	0,4
Moyenne	0,07	0,83	0,73	0,43

Tableau 26. Evolution de la production de diacétyle chez *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis*

Souches \ Heures	4 h	16h	18h	24h
LnL ⁺	0,07	0,2	0,12	0,08
LnL	0,06	0,15	0,09	0,05
LnC ⁺	0,06	0,52	0,48	0,27
LnC1	0,07	0,7	0,65	0,32
LnC2	0,06	0,4	0,37	0,17
LnC3	0,045	0,35	0,31	0,15
Moyenne	0,06	0,48	0,44	0,21

Tableau 27. Evolution de la production du diacétyle chez les *Leuconostocs*

Milieux de cultures

Tableau 49. Composition du milieu MRS bouillon (g / l)

Constituants	g / l
Peptone de caséine	10,00
Extrait de viande	8,00
Extrait de levure	4,00
D (+) glucose	20,00
Di-potassium hydrogénophosphate	2,00
Tween 80	1,00
Di- ammonium hydrogénocitrate	2,00
Sodium acétate	5,00
Magnésium sulfate	2,00
Manganèse sulfate	0,04

Tableau 50. Composition du milieu M17 bouillon (g / l)

Isolément et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle)

Constituants	g / l
Tryptone	2,50
Peptone pepsique de viande	2,50
Peptone papainique de soja	5,00
B –Glycérophosphate de sodium	19,00
Lactose	5,00
Extrait de viande	2,50
Extrait de levure	5,00
Magnésium sulfate	0,25
Acide ascorbique	0,50

NB: MRS et M17- Agar : 15 g d'Agar est ajoutée aux formules précédentes.

Tableau 51. Composition du milieu LTSG (g / l).

Constituants	g / l
Lait écrémé en poudre	100
Teinture de tournesol	2
Glucose	5
Glycérol	100 ml

Tableau 52. Composition du Milieu de Mayeux

Constituants	g / l
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Citrate de sodium	1 g
Glucose	5 g
Gélatine	2,5 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	qsq 1000 mL

Milieu d'Elliker et Anderson

- Tryptone Difco 20 g
- Extrait de levure Difco 5 g
- Glucose 5 g
- Lactose 5 g
- Gélatine 2,5 g
- Chlorure de sodium 4 g
- Agar Difco 15g
- Eau distillée 1000 ml - pH 6,8

Milieu hypersaccharosé

- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 3 g
- Bactocasitone Difco 2,5 g
- Saccharose 150g
- Phosphate dipotassique 2 g

-
- Chlorure de sodium 1 g
 - Sulfate de magnésium à 7 molécules d'eau 0,2 g
 - Agar 15g
 - Eau distillée 1000ml - pH 6,8

Milieu KCA (différenciation Citrate +/Citrate -)**- Base A :**

- Tryptone 20g
- Extrait de levure 5g
- Gelatine 2,5 g
- Glucose 20g
- Lactose 5g
- NaCl 4g
- Citrate Trisodique 2g
- Lactose de calcium 8g
- Agar Eau distillée 15g
- Eau distillée 1000 ml
- Faire fondre le tout sauf l'agar.
- Refroidir à 45-50°C.
- Ajuster le pH à 6,6 – 6,7.
- Ajouter l'agar puis réchauffer.
- Repartir dans les flacons de 250ml à raison de 100 ml.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

- Base B :

Après coagulation d'un lait écrémé par un starter (ferment), recueillir le sérum par filtration sur papier, Stériliser à l'autoclave 20mn à 120°C après l'avoir réparti dans des tubes de 16x160 mm à raison de 12ml.

- Base C : Suspension de citrate de calcium.

- Citrate de calcium 4H₂O 10g,
- Carboxyméthylcellulose 1,5g
- Eau distillée 100ml
- Suspendre 10g de citrate dans 100ml de solution à 1,5% de carboxyméthylcellulose à 45-50°C.
- Mixer le tout.
- Répartir dans des tubes de 16X 160mm à raison de 6ml.
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

- Milieu final :

Pour 100 ml de base A fondue au bain marie bouillant puis ramené à 50°C, ajouter 12 ml de sérum et 6 ml de citrate de calcium (Aseptiquement).

L'ensemencement se fait en surface par fraction de 0,1 ml, étalement avec une pipette râteau.

Lecture :

Citrate + : colonie formant une zone d'éclaircissement autour de la colonie.

Citrate - : colonie sans zone de lyse.

Tests microbiologiques

1/ Etat frais (mobilité)

But : Vérifier la mobilité d'une bactérie.

Technique :

À partir d'un bouillon : On met 2 gouttes de suspension cellulaire sur une lame que l'on recouvre d'une lamelle et lire immédiatement.

À partir d'une gélose : Mettre une goutte d'eau sur la lame avec un fil bouclé puis avec un fil droit toucher une colonie et l'émulsionner dans la goutte d'eau. Recouvrir immédiatement d'une lamelle et lire immédiatement.

Lecture : au microscope

10 x lumière au minimum (à droite)

40 x lumière à 11h ou 1h.

ATTENTION de ne pas confondre mobilité et mouvement brownien.

Le mouvement brownien de bactéries est caractérisé par un déplacement de masse des bactéries, comme si elles suivaient un courant.

La réelle mobilité est lorsque l'on voit une bactérie partir d'un point A vers un point B indépendamment des autres.

2/ Coloration de Gram

But : Permet de distinguer les bactéries Gram + et Gram – en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

Principe : Basé sur la composition chimique de la paroi des bactéries. Le Gram différencie les bactéries selon qu'elles aient conservé le cristal violet après le traitement à l'alcool ou non.

Préparation du frottis :

À partir d'un bouillon : Mettre 2 gouttes de suspension bactérienne préalablement émulsionnée au centre d'une lame. Étaler en couche mince au centre de la lame. Faire sécher complètement sur plaque chauffante et fixer à la flamme 3 fois.

À partir d'une gélose : Mettre une goutte d'eau distillée à l'aide d'un fil bouclé au centre d'une lame. Avec un fil droit prendre une petite partie d'une colonie isolée, la déposer à côté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau. Faire sécher complètement sur plaque chauffante et fixer à la flamme 3 fois.

Technique de coloration :

1- Colorant : Cristal violet 30 sec et rincer à l'eau

2- Mordanceur : Iode gram 30 sec et rincer à l'eau

3- Décolorant : Alcool (compter 1-2-3 si fait à partir d'un bouillon et 1-2-3-4-5 si fait à partir d'une gélose) en inclinant la lame et rincer immédiatement

ATTENTION étape importante

4- Contre-colorant : Safranine 30 sec et rincer à l'eau

5- Sécher la lame avec du papier buvard.

Lecture : À l'immersion : 100x

Gram positif (+) : violet

Gram négatif (-) : rose

3/ Production du diacétyle (acétoïne) par VP (Voges-Proskauer) (bouillon)

But : Mettre en évidence la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne) à partir de la dégradation du glucose.

Principe : L'acide pyruvique produit lors de la dégradation du glucose est transformé en acétoïne, une substance neutre. En présence d'O₂ de l'air et d'un alcali (KOH), l'acétoïne est oxydée pour former du diacétyle, impliqué dans la production de couleur. Si la bactérie possède le bagage enzymatique nécessaire (VP+), elle dégrade les acides organiques en substances neutres, principalement en acétyl-méthyl-carbinol.

Technique d'ensemencement : Onensemence le bouillon avec une colonie prélevée avec un fil bouclé.

Réactif : A : alpha-naphtol

B : hydroxyde de potassium (KOH) 40%

Incubation : 48 heures à 30°C

Lecture et résultat : ajouter de 6 gouttes de réactif A

2 gouttes de réactif B.

Laisser reposer 15 min.

Lire maximum 1h après l'ajout des réactifs.

Négatif (-) : jaune ou inchangé

Positif (+) : rouge

Si une bactérie est VP+ elle est nécessairement MR- de même qu'une bactérie MR+ est nécessairement VP-.

4/ Dégradation du lactose (bouillons)

But : déterminer si la bactérie est capable de dégrader un sucre.

Principe : Lorsque le sucre est dégradé, il en résulte une acidification du milieu qui se traduit par un changement de couleur de ce dernier grâce à un indicateur de pH.

Technique d'ensemencement : Onensemence le bouillon à l'aide d'un fil bouclé à partir d'une culture pure.

Indicateur de pH :

Glucose : Bromocrésol pourpre (Jaune à 5,2)

Lactose : Rouge de phénol (Jaune à 6,8)

Incubation : 24 heures à 30°C

Lecture : milieu jaune ou milieu rouge ou pourpre

Résultat : lactose + (jaune)

lactose – (rouge ou pourpre)

N.B : les indicateurs peuvent changer.

5/ Citrate de Simmons (gélose inclinée en tube)

But : Déterminer si une bactérie est capable ou non de se développer sur un milieu contenant comme seule source de carbone, le citrate de sodium, un sel inorganique.

Principe : Le milieu utilisé contient un autre sel inorganique : le phosphate d'ammonium.

Les bactéries qui sont capables d'utiliser le citrate comme source de carbone sont également capables d'utiliser le phosphate d'ammonium comme source d'azote. Il en résulte la production d'ammoniac (NH₃) qui alcalinise le milieu et le fait changer de couleur.

Technique d'ensemencement :

Strie sur la pente de la gélose avec un fil bouclé. Important : dévisser le bouchon d'¼ de tour.

Indicateur de pH : Bleu de bromothymol

Incubation : 24 à 48 heures à 30°C Si douteux, incubé 24 heures supplémentaires.

Lecture et résultat :

Positif (+) : bleu

Négatif (-) : Vert