

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES AGRO-
ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En sciences alimentaires

Option : Technologie Alimentaire

**Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries
lactiques du fromage traditionnel « *Bouhezza* »**

présenté par:

M^{elle} BOULLOUF Amal

Soutenu devant le Jury composé de :

Président :	NAMOUNE H.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C
Rapporteur :	ZIDOUNE M. N.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C
Examineurs:	OULAMARA H.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C
	BECILA S.	M.C/A I.N.A.T.A.A. U.F.M.C

Année universitaire 2015-2016

Remerciements

Je remercie en premier lieu DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant. Louange à ALLAH Seigneur des mondes, qui m'a permis de réaliser ce travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.

Je tiens avant tout à remercier mon promoteur Pr. ZIDOUNE M.N. qui a accepté de m'encadrer, qui m'a guider par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et m'a bien expliqué les étapes de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier :

M. NAMOUNE pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Dr OULAMARA H. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie aussi Dr BECILLA S. qui a accepté de juger ce travail.

Au Dr. AISSAOUI ZITOUN O. et M. SAOUDI Z. qui ont contribué avec un soin particulier à la réalisation de ce travail. A tout moment ils ont fait preuve de la plus grande disponibilité à mon égard. J'ai apprécié de près leur rigueur, leur simplicité et leur grande générosité. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mes remerciements.

Mes remerciements vont à tout le personnel des laboratoires pédagogiques de l'INATAA et spécialement Me Souad, Me Mounira et Me Nadia qui m'ont aidé avec une grande humeur.

Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes gratitude et respects.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Mon cher papa et ma chère maman

*Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que DIEU vous protège et
vous donne bonne santé*

Mes chers frères et sœurs

*Farid, Abdeldjalil, Kamel, Siham, Mouna, Nora et Lydia je vous réserve
toujours une place dans mon cœur et mes pensées.*

Aux petits Oumnia et Isslam, je vous aime beaucoup

Toutes mes amies

*Iman, Iman, Kahina, Samah, Fayrouz, Amal, Zahra, Hassiba, Romayssa,
Selma, Nour Elhouda, Mouna, Chahrazed, Djihed et Houda.....*

Et toutes mes Amies sans exception.

A ma chère amie BOUKAHIL Iman pour son encouragement et soutien moral

BOULLOUF Amal

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Lait et transformation fromagère	4
I-Généralités sur le lait	4
I-1-Définition	4
I-2- Composition du lait	4
II- Technologie fromagère.....	5
II-1- Définition.....	5
II-2-Etapes de la transformation fromagère.....	5
II-2-1-Coagulation.....	6
II-2-1-1-Coagulation par voie acide	6
II-2-1-2-Coagulation par voie enzymatique.....	6
II-2-1-3-Coagulation mixte	6
II-2-2- Egouttage.....	7
II-2-3- Affinage.....	7
III-Processus de l'affinage.....	8
III-1-Glycolyse.....	8
III-2-Lipolyse.....	9
III-3-Protéolyse	9
IV- Fromage traditionnel algérien <i>Bouhezza</i>	9
IV-1- Procédé de fabrication de <i>Bouhezza</i>	10
IV-1-1-Préparation de la <i>Chekoua</i>	10
IV-1-2-Fabrication de <i>Bouhezza</i>	11
IV-2-Valeur nutritionnelle de <i>Bouhezza</i>	12
IV-3- Flore lactique de <i>Bouhezza</i>	13
IV-4- Profil aromatique de <i>Bouhezza</i>	13
Chapitre II : Les bactéries lactiques	14
I-Généralités sur les bactéries lactiques	14
I-1-Définition et caractéristiques	14
I-2-Habitat et origine.....	14

II-Classification des bactéries lactiques.....	15
III-Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	17
III-1-Le genre <i>Lactobacillus</i>	17
III-2-Le genre <i>Lactococcus</i>	17
III-3-Le genre <i>Streptococcus</i>	18
III-4-Le genre <i>Enterococcus</i>	18
III-5-Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	19
III-6-Le genre <i>Pediococcus</i>	19
III-7-Le genre <i>Bifidobacterium</i>	20
III-8-Le genre <i>Vagococcus</i>	20
IV-Métabolisme des bactéries lactiques.....	20
IV-1-La glycolyse.....	20
IV-2- La protéolyse.....	21
IV-3- La lipolyse.....	22
V-Intérêt des bactéries lactiques.....	23
V-1-Domaine alimentaire.....	23
V-1-1-Pouvoir texturant.....	23
V-1-2-Pouvoir aromatisant.....	23
V-1-3-Pouvoir acidifiant.....	24
V-1-4-Pouvoir protéolytique.....	24
V-1-5-Pouvoir lipolytique.....	25
V-1-6-Pouvoir antibactérien.....	25
V-2-Domaine de la santé.....	26
Partie II : Matériels et méthodes.....	27
I-Méthodologie générale.....	27
II- Echantillonnage.....	29
II-1- Origine de fabrication des échantillons.....	29
II-2- Diagramme de fabrication.....	29
III- Caractérisation physicochimique.....	30
III-1- Détermination du pH et de l'acidité titrable.....	30
III-2- Détermination de la matière sèche.....	31
IV- Caractérisation microbiologique.....	31
IV-1- Dénombrement de la flore mésophile « totale ».....	32
IV-2- Dénombrement des lactobacilles.....	32

IV-3- Dénombrement des streptocoques lactiques	32
IV-4- Dénombrement des halotolérants	32
IV-5- Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	32
IV-6- Dénombrement de la flore fongique	33
IV-7- La recherche de <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	33
IV-8- La recherche des Streptocoques fécaux	33
V- Isolement et purification des bactéries lactiques	34
V-1- Prélèvement des colonies isolées et purification	34
V-2- Conservation des isolats	34
V-2-1- La conservation à court terme	34
V-2-2- La conservation à long terme	34
VI- Identification des bactéries lactiques isolées	35
VI-1- Examen macroscopique microscopique	36
VI-2- Caractères physiologiques et biochimiques	36
VI-2-1- Test de la catalase	36
VI-2-2- Mannitol-Mobilité	36
VI-2-3- Température de croissance	36
VI-2-4- Thermorésistance	37
VI-2-5- Croissance en présence de NaCl	37
VI-2-6- Culture à pH 9,6	37
VI-2-7- Production d'acétoïne	37
VI-2-8- Culture sur le lait de Sherman	37
VI-2-9- Recherche de type fermentaire	38
VI-2-10- Métabolisme des hydrates de carbone	38
VI-2-11- Recherche de la β -galactosidase (ONPG)	39
VI-2-12- Recherche de la citratase	39
VI-2-13- Recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)	39
VI-2-14- Hydrolyse de l'amidon	40
VI-2-15- Résistance au tellurite de potassium	40
VI-2-16- Production des exopolysaccharides	40
VII- Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées	40
VII-1- Pouvoir acidifiant	40
VII-2- Pouvoir protéolytique	41
VII-3- Production des composés aromatiques	41

VII-4- Pouvoir antimicrobien	41
VII-4-1- Souches pathogènes à tester.....	41
VII-4-2- Détection d'activité antimicrobienne la méthode de diffusion en puits	42
Partie III : Résultats et discussion	44
I- Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de fromage « <i>Bouhezza</i> ».....	44
I-1- pH et acidité titrable	44
I-2- Extrait sec total.....	45
II- Caractéristiques microbiologiques des échantillons de fromage « <i>Bouhezza</i> »	45
II-1- Dénombrement des principales flores	46
II-1-1- Flore aérobie mésophile totale	46
II-1-2- Streptocoques lactiques	46
II-1-3- Lactobacilles	47
II-1-4- Flore halotolérante	47
II-1-5- Levures et moisissures.....	48
II-2- Flore de contamination et flore pathogène	49
III- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du fromage traditionnel <i>Bouhezza</i>	51
III-1- Examen macroscopique et microscopique	51
III-1-1- Caractérisation macroscopique.....	51
III-1-2- Caractérisation microscopique	52
III-2- Tests physiologiques et biochimiques	54
III-2-1- Le type fermentaire des isolats et recherche de différentes enzymes	54
III-2-2- Croissance à différentes températures de croissance et la thermorésistance ...	56
III-2-3- Croissance aux différentes conditions de culture	57
III-2-3- Profil fermentaire.....	59
IV- Aptitudes technologiques des isolats de bactéries lactiques	65
IV-1- Pouvoir acidifiant	65
IV-2- Pouvoir protéolytique	68
IV-3- Pouvoir aromatisant	70
IV-4- Pouvoir antimicrobien.....	72

CONCLUSION ET PERSPECTIVES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ANNEXES

Liste des abréviations

- ADN:** Acide Désoxyribonucléique
- ADH:** arginine déshydrolyase
- ALC:** acides linoléiques conjugués
- ARN:** Acide Ribonucléique
- ATCC:** American Type Culture Collection
- C :** *Carnobacterium*
- CIP** Collection de l'institut Pasteur
- CMP:** caséinomacropéptide
- β-gal:** β-galactosidase
- E :** *Enterococcus*
- EPS:** Exopolysaccharides
- FTAM :** flore totale aérobie mésophile
- g :** gramme
- G+C:** le ratio guanine + cytosine
- GDL:** gluconodéltalactone
- GNO:** gélose nutritive ordinaire
- h:** heure
- j :** jour
- L:** litre
- LAB:** Acid Lactic Bacteria
- Lb :** *Lactobacillus*
- Lc :** *Lactococcus*
- Ln :** *Leuconostoc*
- M :** *Micrococcus*
- MGES:** Taux de Matière Grasse dans l'Extrait Sec
- NPN:** non-protein nitrogen
- NSLAB :** Non Starter Lactic Acid Bacteria
- ONPG:** Ortho-nitrophényl-β-D galacto-pyranoside
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*
- Pc:** *Pediococcus*
- St:** *Streptococcus*

TEFD : Teneur en Eau dans le Fromage Dégraissé

TMM : Traditional Mountain Malga cheese

TTGE: Temporal Temperature Gel Electrophoresis

UFC: Unité formant Colonie

VP: Voges- Proskaeur

W : *Weissella*

Liste des figures

Figure 1. Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : (a) protéolyse, (b) lipolyse (c) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate (MC SWEENEY et SOUSA, 2000)	8
Figure 2. Diagramme simplifié de la fabrication contrôlée du fromage <i>Bouhezza</i>	12
Figure 3. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.....	16
Figure 4. Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.....	21
Figure 5. Système protéolytique des bactéries lactiques.....	22
Figure 6. Principales voies de la lipolyse.....	22
Figure 7. Etapes de la méthodologie de l'étude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques de <i>Bouhezza</i>	27
Figure 8. Isolement, purification et conservation des isolats de bactéries lactiques.....	35
Figure 9. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien des LAB par la technique des puits...43	
Figure 10. Aspect circulaire de couleur blanche des colonies des lactobacilles (a) et des streptocoques lactiques (b) sur les milieux MRS et M17 solides après incubation à 30°C pendant 48 heures	51
Figure 11. Aspect morphologique cellulaire des cultures pures des isolats (L2, S8 et S2) appartenant au lactobacilles et lactocoques (x100)	53
Figure 12. Test de l'ADH des isolats sur milieu Möeller à l'arginine.....	55
Figure 13. Test de croissance des coques isolées sur 0,1% bleu de Sherman.....	57
Figure 14. Test de croissance des coques isolées sur 0,3% bleu de Sherman.....	57
Figure 15. Aspect des souches S2, S3, S9, L3 et L6 sur gélose hypersaccharosée	58
Figure 16. Répartition des espèces de la collection lactique (%)	64
Figure 17. Diamètres des zones de protéolyse par les isolats de bactéries lactiques sur milieux MRS et M17 additionnés du lait écrémé (en mm).....	69
Figure 18. Production de l'acétoïne par des souches de lactobacilles	71
Figure 19. Production de l'acétoïne par des coques lactiques.....	71
Figure 20. Vérification de la pureté des bactéries pathogènes par la coloration de Gram.....	73
Figure 21. Diamètres des zones d'inhibition des isolats lactiques vis-à-vis de (a) <i>E. coli</i> (DH5), (b) <i>L. monocytogenes</i> ATCC et (c) <i>B. cereus</i>	75

Liste des tableaux

Tableau 1. La composition de lait de vache	4
Tableau 2. Principaux genres de bactéries lactiques.....	16
Tableau 3. Echantillons de fromage <i>Bouhezza</i>	29
Tableau 4. Caractéristiques physicochimiques des échantillons de <i>Bouhezza</i>	44
Tableau 5. Evaluation quantitative des flores microbiennes des différents échantillons de « <i>Bouhezza</i> » fabriqué dans la peau de chèvre (en UFC/g de fromage)	45
Tableau 6. Résumé de l'observation macroscopique des souches isolées du fromage traditionnel <i>Bouhezza</i>	52
Tableau 7. Critères morphologiques, le gram et le test de la catalase des sept isolats présumés des bactéries lactiques isolées du fromage traditionnel <i>Bouhezza</i>	53
Tableau 8. Représente les résultats du type fermentaire, l'arginine déshydrogénase (ADH), la β -galactosidase, l'hydrolyse de l'amidon, de la gélatine et du citrate des isolats	55
Tableau 9. Croissance à différentes températures et la thermorésistance des isolats retenus.	56
Tableau 10. Tests de la résistance des souches isolées à différentes conditions de culture....	58
Tableau 11. Profil fermentaire des souches isolées	59
Tableau 12. Résultats de l'identification des espèces après comparaison avec des tableaux référentiels de DE ROISSART et LUQUET, (1994) et ZHANG et CAI (2014).....	64
Tableau 13. Evolution de l'acidité (en °D) et du pH des isolats testés au cours du temps	66
Tableau 14. Diamètres de protéolyse par les isolats de bactéries lactiques (en mm)	68
Tableau 15. Diamètres des zones d'inhibition des surnageants natifs des bactéries lactiques testées vis-à-vis des souches pathogènes (en mm)	74

Introduction

Introduction

Les fromages traditionnels sont caractérisés par un lien fort avec leur terroir d'origine et attestent de l'histoire et de la culture de la communauté qui les produit. Chaque fromage traditionnel provient de systèmes complexes qui lui donnent des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Ces caractéristiques sont liées à divers facteurs de biodiversité, comme l'environnement, le climat, la prairie naturelle, la race des animaux, l'utilisation de lait cru et de sa microflore naturelle (LICITRA, 2010).

La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (lait fermenté, fromage). REHMAN *et al.* (2000) ont montré que les fromages au lait cru avaient un arôme plus intense et du goût plus fruités et piquants que des fromages au lait pasteurisé. Aussi CHAMMAS *et al.* (2006) et PATRIGNANI *et al.* (2006) ont signalés que les produits laitiers fabriqués traditionnellement à partir du lait cru ont des saveurs typiques et des qualités nutritionnelles de plus en plus recherchées par le consommateur. D'autre part, la flore lactique de ces produits, principalement les fromages, a fait l'objet de plusieurs études d'identification et de sélection dans le but d'enrichir d'autres produits laitiers.

La composition des communautés microbiennes des fromages au lait cru intervient dans l'élaboration de leurs caractéristiques organoleptiques et hygiéniques. Les travaux de synthèse concernant les toxi-infections alimentaires collectives ont démontré que les fromages au lait cru n'apportent pas plus de risques que les fromages industriels fabriqués à partir de lait pasteurisé (MONTEL *et al.*, 2003).

Un fromage traditionnel propre à lui est donc le siège du développement d'un grand nombre de groupes bactériens qu'il importe de définir et de décrire tout au long de sa fabrication et de son affinage. Un grand nombre de fromages au lait cru sont fabriqués dans le bassin méditerranéen, par contre ceux fabriqués dans la peau de chèvre sont très peu connus c'est le cas du fromage traditionnel Algérien *Bouhezza*.

Bouhezza est un fromage de terroir, connu depuis longtemps dans la région *Chaouia* de l'est du pays regroupant principalement les wilayas d'Oum El Bouaghi, Batna, Khenchla et Tebessa. C'est le produit de transformation du lait de chèvre et de brebis. Toutefois, la tendance actuelle semble s'orienter vers l'utilisation du lait de vache.

Plusieurs études ont été réalisées sur le fromage *Bouhezza* au niveau du laboratoire de Nutrition et de Technologies Alimentaire (L.N.T.A.) par l'équipe « Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires » (T.E.P.A.). Ces études ont montré la richesse de *Bouhezza* en flore lactique et principalement par les lactobacilles (SAOUDI, 2012 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004). Le profil aromatique du fromage est constitué principalement par les esters et les aldéhydes. Ces composés font une partie intégrante de l'arôme de *Bouhezza* qui évolue du *Lben*, matière première, au fromage affiné (AISSAOUI ZITOUN, 2014).

La qualité hygiénique de *Bouhezza* est une caractéristique importante. L'absence des pathogène tel que *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* et *E. coli* dans un fromage qui est fabriqué traditionnellement et sans contrôle des conditions d'hygiène a été signalée par plusieurs auteurs (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; SAOUDI, 2012). Il reste donc à préciser le lien entre la diversité de la flore lactique ainsi que sa fonctionnalité dans le fromage *Bouhezza*. Cet objectif ne pourra être atteint que si nous sommes capables d'évaluer cette diversité microbienne aussi bien en termes de composition que d'activité.

L'étude des propriétés technologiques des bactéries lactiques isolées à partir du fromage traditionnel *Bouhezza* correspond à un sujet intéressant car aucune information est disponible dans la littérature sur les microorganismes isolées à partir de ce fromage et ayant une importance technologique. AISSAOUI ZITOUN (2004) a signalé la présence en nombre intéressant de flore protéolytique et de flore lipolytique.

Le présent travail vise l'étude du pouvoir technologique de quelques souches isolées du fromage *Bouhezza* de ferme. Les pouvoirs visés concernent l'activité acidifiante, les propriétés enzymatiques (activité protéolytique et lipolytique) et la production de métabolites d'intérêt (peroxyde d'hydrogène, acides organiques et bactériocines).

Notre manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre sur le lait, des généralités sur la technologie fromagère en générale et le processus d'affinage, et sur la fromagerie de *Bouhezza*. Le deuxième chapitre donne une présentation sur les bactéries lactiques, leur classification et leurs aptitudes technologiques.

Dans la seconde partie du manuscrit nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Elle comporte la caractérisation

physicochimique et microbiologique du fromage ainsi que les techniques d'identification des souches lactiques isolées et purifiées et l'étude de leurs propriétés technologiques. La dernière partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Lait et transformation fromagère

I-Généralités sur le lait

I-1-Définition

Le lait a été défini en 1908 au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (ALAIS, 1975).

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse, d'une saveur douceâtre et d'un pH légèrement acide (6,6 à 6,8), proche de la neutralité (ALAIS, 1984).

I-2- Composition du lait

Le lait est un milieu multiphasique : une phase aqueuse continue contenant essentiellement le lactose et des minéraux et des éléments dispersés de nature lipidique (globules gras) et de nature protéique (micelles de caséines) (MAHAUT *et al.*, 2000). De très nombreux facteurs peuvent intervenir sur la composition du lait : l'espèce, la race, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire, l'alimentation, etc. Le tableau 01 montre la composition du lait de vache.

Tableau 1. La composition de lait de vache (ALAIS et LINDEN, 2004)

Eléments	Composants (g/l)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) + eau liée : 3,7%
Glucides : lactose	49	Solution
Lipides : -matière grasse proprement dite -lécithine (phospholipides) -partie insaponifiable (stérols, carotènes, tocophérol)	35 34 0,5 0,5	Emulsion de globules gras (3 à 5 μm)
Protides : -caséines	34 27	Suspension micellaire de phospho-caséinate de calcium (0,08 à 0,12 μm)

-protides solubles (globuline, albumines)	5,5	Solution colloïdale
-substances azotées non protéiques	1,5	Solution vraie
Sels :	9	Solution ou état colloïdal
-acide citrique	2	
-acide phosphorique	2,6	
-acide chlorhydrique	1,7	
Constituants divers : (vitamines, Enzymes gaz dissous)	Traces	
Extrait sec total	127	
Extrait sec non gras	92	

Une connaissance approfondie de la composition du lait, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (VIGNOLA, 2002).

II- Technologie fromagère

II-1- Définition

Les fromages sont des formes de conservation et de report ancestrales de la matière utile du lait (Protéines, matière grasse ainsi qu'une partie du calcium et phosphore), dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (JEANTET *et al.*, 2008).

La dénomination « fromage » est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse (directive n°88-1206 décembre 1988, article 1^{er}) (MAHAUT *et al.*, 2000).

II-2-Etapes de la transformation fromagère

La fromagerie est donc basée sur différentes étapes, dont la coagulation, l'égouttage et l'affinage.

II-2-1-Coagulation

La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnant des éléments solubles du lait. La coagulation peut se réaliser par l'acidification, par l'action d'un enzyme ou encore par l'action combinée des deux (VIGNOLA, 2002).

II-2-1-1-Coagulation par voie acide

Selon MAHAUT *et al.* (2000), la coagulation par voie acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i = 4,6$) par acidification du lait :

- biologique par des ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique, ou
- par acidification chimique (injection de CO_2 ou addition de gluconodelta lactone (GDL) ou
- par ajout de protéines sériques à pH acide.

II-2-1-2-Coagulation par voie enzymatique

Un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne ont la propriété de coaguler le lait (VIGNOLA, 2002). La coagulation enzymatique est quant à elle due à l'action de la présure qui est une enzyme protéolytique provenant de caillettes de veaux non sevrés. Cette enzyme correspond en réalité à deux fractions actives : l'une majeure (80 %), constituée par la chymosine, l'autre mineure (20 %), est représentée par la pepsine (ECK, 1990). On distingue trois phases :

- Coagulation par hydrolyse de la caséine κ au niveau de la liaison phénylalanine (105) et méthionine (106) ce qui provoque la libération de caséinomacropéptide hydrophile assurant la stabilité de la micelle (VEISSEYRE, 1975 ; MAHAUT *et al.*, 2000).
- Hydrolyse de la caséine κ (80 à 90 %) à $pH = 6,6$. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel (MAHAUT *et al.*, 2000).
- Réorganisation des liaisons entre les paracaséines des micelles de caséines par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être des ponts disulfures forme le coagulum (BRULE *et al.*, 1997).

II-2-1-3- Coagulation mixte

Résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La combinaison conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des

fromages à pâtes pressée non cuite (MAHAUT *et al.*, 2000 ; JEANTET *et al.*, 2008). Les propriétés des gels formés et leur aptitude à l'égouttage sont intermédiaires entre celles du coagulum obtenu par voie enzymatique et celle du coagulum obtenu par voie acide (BRULE *et al.*, 1997).

II-2-2- Egouttage

Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique (JEANTET *et al.*, 2008). Selon BERTRAND (1988), il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

- expulsion du sérum par le coagulum qui se contracte et se concentre (synérèse) ;
- séparation du sérum et du caillé par action physique.

La pâte obtenue est salée par addition de chlorure de sodium. Le sel inhibe certaines proliférations microbiennes, complète l'égouttage du caillé et relève la saveur du fromage (ALAIS et LINDEN, 1993).

En fonction de la technologie utilisée pour l'égouttage, le fromage aura une composition et une teneur en eau variables. Par exemple, dans les caillés lactiques, l'acidification et la déminéralisation empêchent le caillé de se contracter et freinent l'égouttage, ce qui produit des caillés plus humides (RAMET, 2009).

II-2-3- Affinage

Cette opération est la plus importante dans les fromages affinés. C'est une période de maturation pendant laquelle les propriétés sensorielles des fromages se développent grâce à une variété de réactions biochimiques comme l'utilisation des sucres, des acides organiques, des protéines et des lipides du caillé (MOLIMARD et SPINLER, 1996 ; MC SWEENEY et SOUSA, 2000 ; MC SWEENEY, 2004). L'affinage des fromages est en grande partie tributaire des enzymes, qui sont surtout d'origine microbienne. Tous les facteurs qui touchent le développement des microorganismes, la production d'enzymes et l'activité enzymatique auront des effets importants sur le déroulement de l'affinage (VIGNOLA, 2002).

Selon MIETTON (1995), l'affinage est en fait la résultante de trois principales actions biochimiques qui se déroulent simultanément à savoir :

- la dégradation des protéines ;
- l'hydrolyse de la matière grasse ;

- la fermentation du lactose.

Il résulte de ces réactions le développement de la saveur et de l'arôme typique des fromages grâce à de nombreux composants appartenant à des classes chimiques variées (acides, alcools, esters, produits sulfurés, etc.) (MAHAUT *et al.*, 2000).

III-Processus de l'affinage

Un aperçu général des réactions biochimiques qui se déroulent pendant l'affinage des fromages est illustré dans la figure 01.

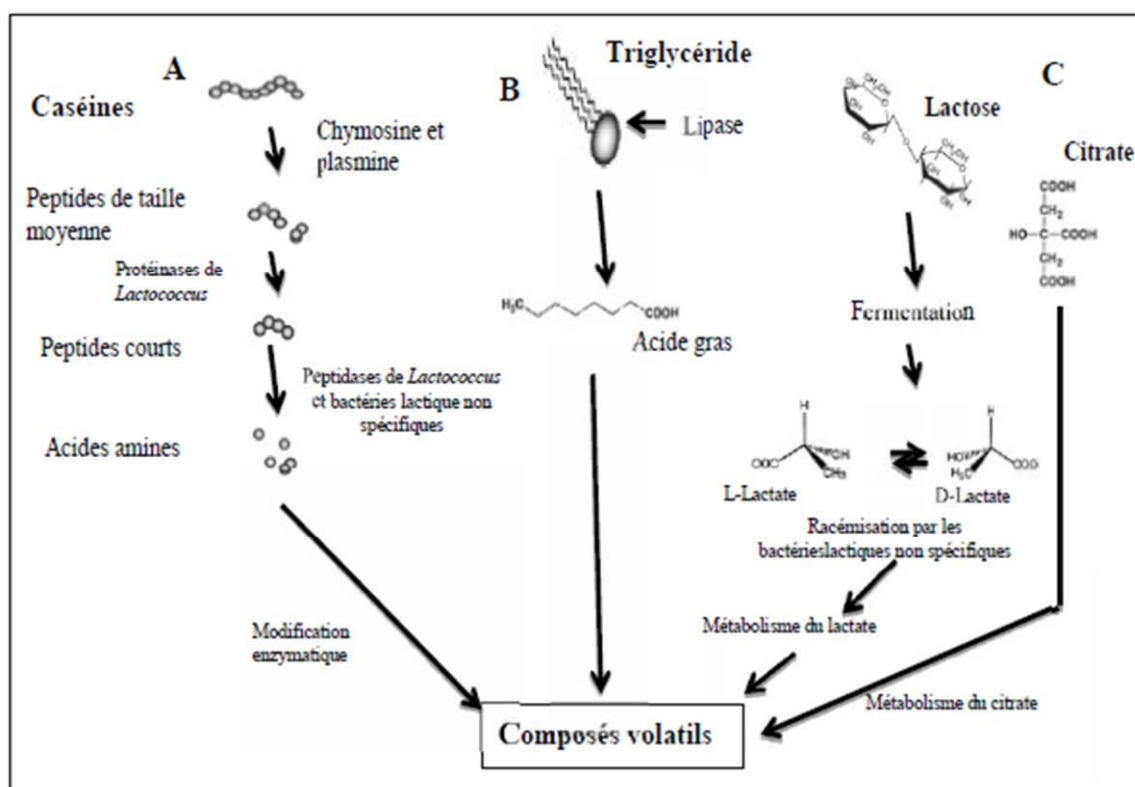


Figure 1. Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : (a) protéolyse, (b) lipolyse (c) métabolisme du lactose, du lactate et du citrate (MC SWEENEY et SOUSA, 2000)

III-1- Glycolyse

Le lactose peut subir différents types de fermentation (homolactique et hétérolactique), il donne du CO_2 , de l'éthanol et de l'acide acétique. La fermentation alcoolique par les levures donne du CO_2 , de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. A partir de l'acide citrique, les bactéries lactiques produisent de l'acétoïne, du diacétyle et du butanediol. A partir de l'acide lactique, la fermentation propionique donne de l'acide propionique et du CO_2 . L'oxydation par le cycle de Krebs, due aux levures et aux moisissures produit du CO_2 et de l' H_2O (SERHAN, 2008).

III-2-Lipolyse

CHOISY *et al.* (1984) mentionnent que tous les micro-organismes des fromages sont susceptibles de produire des lipases mais en quantités plus ou moins importantes selon les espèces ou les souches. Les enzymes lipolytiques coupent les liaisons esters des triacylglycérols, produisant des acides gras libres, des mono- et des diacylglycérols (DEETH et TOUCH, 2000). Les acides gras libres sont des précurseurs importants des réactions cataboliques, qui produisent des composés volatils et contribuent à la flaveur des fromages. Cependant, ces réactions cataboliques ne sont pas très bien maîtrisées (MC SWEENEY et SOUSA, 2000).

III-3- Protéolyse

C'est le phénomène le plus important de la phase d'affinage car il permet d'affecter indirectement la texture par une augmentation du pH suite à la production de NH_3 qui a lieu après le catabolisme des acides aminés. Le rôle majeur de la protéolyse dans les fromages est la production d'acides aminés qui sont des précurseurs pour une multitude de réactions cataboliques qui aboutissent à une grande variété de composés volatils (alcools, aldéhydes, acides ramifiés, esters, composés soufrés, phénols, ...) responsables de la typicité des fromages (MC SWEENEY et SOUSA, 2000).

LENOIR *et al.* (1983), font observer qu'en partant du caillé égoutté qui contient 4 à 8% de substances azotées solubles dans l'eau, on arrive en fin de maturation, dans les hâloirs, à un fromage présentant 20 à 50% de substances azotées.

IV- Fromage traditionnel algérien *Bouhezza*

Bouhezza est un fromage traditionnel affiné, à pâte mi- molle, des régions de l'Est Algérien (Oum el Bouaghi, Khenchella, Batna, Biskra, etc...) réputées par une pratique importante de l'élevage extensif des caprins et des ovins. En effet, à l'origine, le *Bouhezza* était traditionnellement le produit de la transformation du lait de chèvre et de brebis; toutefois la tendance actuelle semble s'orienter vers l'utilisation du lait de vache (MEKENTICHI, 2003; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). Sa spécificité est l'utilisation d'une peau d'animaux « *Chekoua* » comme contenant de fromage et séparateur de lactosérum. Un salage en masse et des ajouts successifs de *Lben* et de lait cru permettent l'accumulation de la pâte fromagère dans la *Chekoua*. Ainsi, et après au-moins 4 semaines le fromage est affiné (AISSAOUI ZITOUN, 2014). Au stade de la consommation, le fromage est pétri avec

incorporation de poudre de piment rouge, ce qui rend la pâte légèrement piquante (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006).

IV-1- Procédé de fabrication de *Bouhezza*

IV-1-1-Préparation de la *Chekoua*

La fabrication du fromage nécessite la confection de la peau d'animaux sous forme de *Chekoua*. La *Chekoua* de *Bouhezza* se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau de l'animale et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, elle joue à la fois le rôle d'un séparateur de phase, c'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé et d'un contenant de la masse fromagère qui s'accumule au cours du temps. (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006, AISSAOUI ZITOUN, 2014).

La préparation de la *Chekoua* consiste à utiliser la peau de différentes races (chèvre ou brebis). La peau de chèvre ou de chevreau semble faciliter l'égouttage, elle est plus épaisse, solide et résistante aux chocs (BENMASSAI et FATHALLAH, 2009).

Avant utilisation de la peau, cette dernière nécessite un traitement approprié, elle est laissée se putréfier à température ambiante, environ 2 à 7 jours pour faciliter l'arrachage des poils ou de la laine. Après un lavage avec de l'eau, la peau est traitée principalement avec le sel et le genièvre avec possibilité d'incorporer d'autres produits (tanins, romarin, semoule, orge,..) (AISSAOUI ZITOUN, 2004). Ensuite la peau est laissée au repos pendant une à deux semaines pour éliminer l'odeur de putréfaction et la rendre plus solide. Après cette étape, la peau doit être retournée (coté poile à l'intérieur et coté chaire à l'extérieur) puis elle sera nouée et ficelée pour lui donner la forme d'un sac. La *Chekoua* doit être mis en contact avec le *lben* pendant quelques heures à une nuit afin d'éliminer le reste des débris de genièvre et des odeurs putrides.

D'après SENOUSSE (2013), la microflore initiale de la *Chekoua* est caractérisée par une faible charge de bactéries mésophiles et absence de levures, de moisissures. L'absence de la flore pathogène est un résultat intéressant pour la qualité du fromage. Le *lben*, utilisé pour le dernier rinçage de la *Chekoua* induit une élévation de la charge microbienne avec apparition de levures.

L'analyse de la *Chekoua* de fabrication du fromage *Bouhezza* par la technique PCR-TTGE a montré une diversification microbienne avec prédominance des bactéries : *Lactobacillus plantarum*, *Lb. fermentum*, *Leuconostoc cremoris* ou *Ln. mesenteroides*,

Staphylococcus equorum ssp. *linens*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb rhamnosus*, *Lb. zaeae*, *Bifidobacterium infantis*, *Brevibacterium casei* (SENOUSSI, 2013).

IV-1-2-Fabrication de *Bouhezza*

La fabrication traditionnelle du fromage *Bouhezza* n'obéit pas aux règles générales de la fromagerie où les étapes de coagulation, salage, égouttage et affinage sont des étapes successives. Le procès de *Bouhezza* assure la réalisation de ces différentes étapes simultanément et continuellement sur plusieurs semaines voire des mois. Il débute habituellement en mars/avril, partant d'une quantité initiale de *Lben*, compléter durant toute la période de fabrication par des ajouts de *Lben* et à la fin de lait cru, à condition que le *Lben* utilisée soit peu gras et peu acide. La durée de fabrication de *Bouhezza* est comprise entre 2 à 9 mois, elle est en fonction de l'abondance laitière et de la taille de la *Chekoua*. (AISSAOUI ZITOUN, 2014). La *Chekoua* est suspendue dans un endroit aéré, et à l'ombre et bien entretenue au cours de la fabrication par des lavages réguliers à l'aide de l'eau avec raclage de sa surface externe (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

La poudre de piment rouge piquant est mélangée avec une quantité du lait cru lors du dernier ajout couplé avec une bonne homogénéisation du fromage dans la *Chekoua*. L'addition de *h'rissa*, poivron noir, vinaigre est possible selon LEMOUCHI (2007).

Pour la conservation du fromage après fabrication, la *Chekoua* reste un des moyens qui permet une conservation hors réfrigération durant une période plus au moins longue (quelques semaines). D'autres ustensiles (bocaux en poterie/verre ou récipients alimentaires) sont utilisés avec réfrigération (AISSAOUI ZITOUN, 2014). Et peut être consommé sous forme de pâte plus ou moins ferme, de tartine sur pain ou déshydraté après séchage et broyage manuel pour assaisonnement de plats traditionnels (*Aiche, Couscous...*) (ZAIDI, 2002).

De point de vue consistance, la pâte du *Bouhezza* est peu molle et caractérisée par un goût peu piquant de piment rouge et une acidité assez prononcée. D'après les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), *Bouhezza* retrouve sa place dans la classification du Codex alimentarius, c'est un fromage à pâte molle (Teneur en Eau dans le Fromage Dégraissé « TEFD » de 72%), migras (Taux de Matière Grasse dans l'Extrait Sec « MGES » de 30% et affiné principalement dans la masse. La figure 02 présente les différentes étapes de la fabrication artisanale du fromage *Bouhezza* :

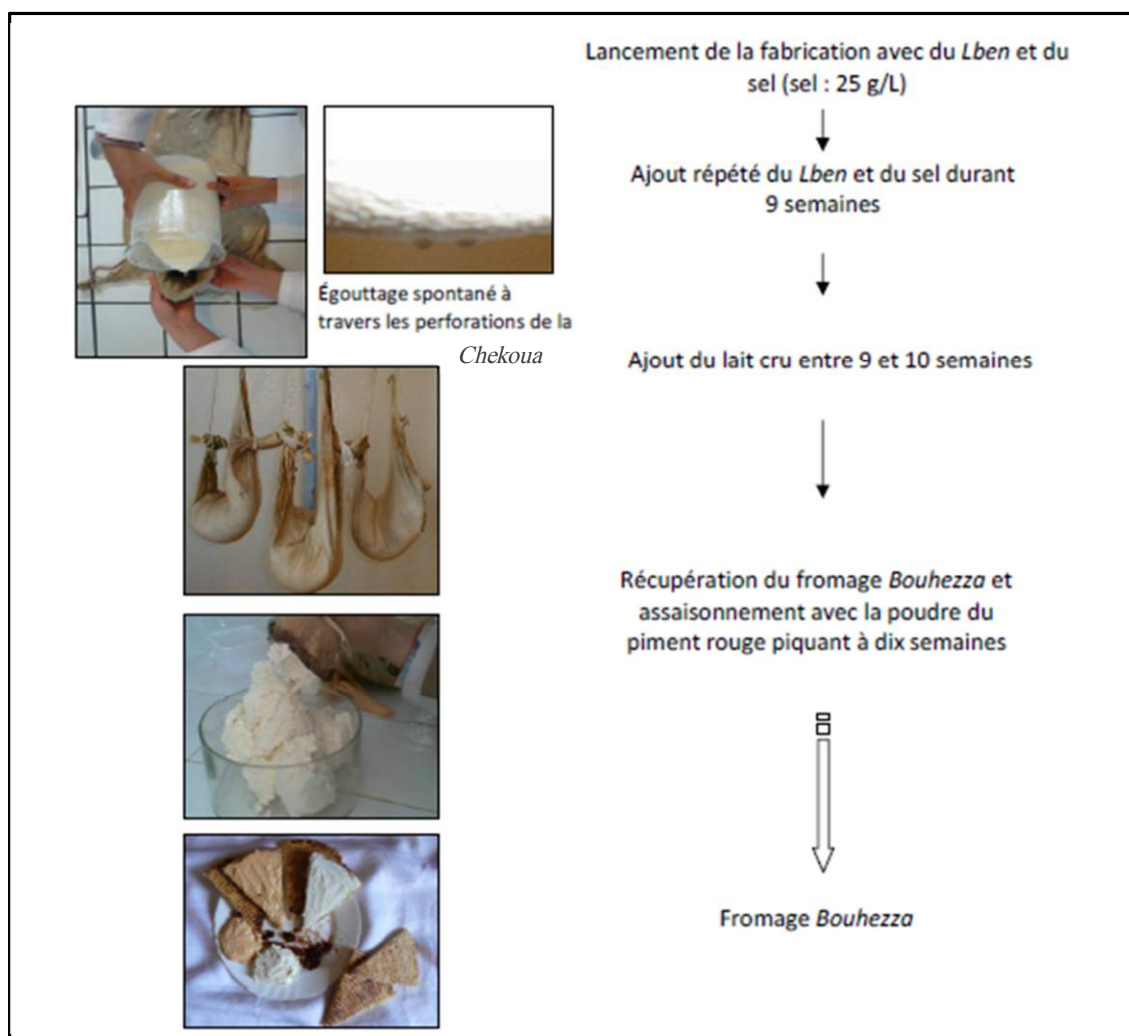


Figure 2. Diagramme simplifié de la fabrication contrôlée du fromage *Bouhezza* (AISSAOUI ZITOUN, 2014)

IV-2- Valeur nutritionnelle de *Bouhezza*

De point de vue nutritionnel, *Bouhezza* peut apporter une portion d'acides gras de bonne qualité, car il renferme une quantité non négligeable en acides linoléiques conjugués. En plus, le ratio de l'acide linoléique (oméga 6)/l'acide α -linoléique (oméga 3) semble être équilibré (BELBELDI, 2013). Selon AISSAOUI ZITOUN (2014), la teneur en matière grasse dans le *Bouhezza* de ferme augmente en fonction de la durée d'affinage passant de $7,34 \pm 1,76$ à $12,57 \pm 5,15$ g/100 g du fromage frais et de $27,65 \pm 7,90$ à $39 \pm 8,07$ g/100 g dans la matière sèche (AISSAOUI ZITOUN, 2014). D'autre part, les échantillons de *Bouhezza* épicés par la poudre du piment rouge ont montré un contenu en β -carotène plus élevé par rapport aux autres. Le piment rouge augmente la concentration de ce pigment possédant des propriétés antioxydantes intéressantes (BELBELDI, 2013).

En moyenne, 100 g de *Bouhezza* dans un régime, contribue dans les apports diététiques recommandés par 1,46% à 12% en acide linoléique, par 3% en acide linoléique et par 0,8-1% en acides linoléiques conjugués (ALC), par 0,5% à 3,3% en β -carotène et par 1,5% à 5% en vitamine E (BELBELDI, 2013). La teneur en protéines du fromage *Bouhezza* de ferme varie entre $12,22 \pm 0,62$ % et $15,88 \pm 0,58$ g/100 g de fromage (AISSAOUI ZITOUN, 2014).

IV-3- Flore lactique de *Bouhezza*

Selon les travaux réalisés par SAOUDI (2012), l'écosystème de *Bouhezza* n'est pas très riche, ça a été observé par la dominance principale de *Lb. plantarum* et *Lactococcus lactis* poursuivie par *Lc. Helveticus* et/ou *Lc. acidophilus* et/ou *Lc. crispatus* et *Staphylococcus equorum* ssp. *linens*.

D'après les résultats de AISSAOUI ZITOUN (2014), d'autres espèces de lactobacilles ont été identifiées dans le fromage *Bouhezza*, qui sont *Lb. paracasei* et *Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. diolivorans* et *Lb. hilgardii*. Le *Bouhezza* de 120 jours d'affinage avait une charge microbienne faible mais variée avec la présence de *Lb. plantarum*, *Lb. johnsonii* or *Lb. gasseri*; *Staphylococcus equorum* ssp. *Linens* ; *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* or *Lb. Crispatus*; *Lc. Lactis* ssp. *cremoris* ; *C. flavescens*; *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. zae* or *B. infantis*.

IV-4- Profil aromatique de *Bouhezza*

La fraction aromatique du fromage *Bouhezza* dépend à la fois de la durée d'affinage et du savoir-faire des familles, principalement le type de piment ajouté lors de la consommation (piment rouge piquant ou *Hrissa* épicé). Son profil aromatique est principalement constitué par les esters et les aldéhydes. D'autres composés de différentes classes chimiques sont détectés tels que les acides, les alcools et les terpènes. L'ensemble de ces composés fait partie intégrante de l'arôme de *Bouhezza* qui évolue du *Lben*, matière première, au fromage affiné (AISSAOUI ZITOUN, 2014).

Chapitre II : Les bactéries lactiques

I-Généralités sur les bactéries lactiques

I-1-Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (BADIS *et al.*, 2005). Elles peuvent avoir différentes formes: sphériques (coques/genre *Streptococcus* et *Lactococcus...*), en bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc ssp.*) (LUQUET et CORRIEU, 2005; GALVEZ *et al.*, 2011).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 4,5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (SALMINEN *et al.*, 2004; KÖNIG et FRÖHLICH, 2009 ; PRINGSULAKA *et al.*, 2011).

Les LAB ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; HOGG, 2005).

I-2-Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (LEVEAU et BOUIX, 1993 ; HASSAN et FRANK, 2001).

Certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les LAB peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (DE ROISSARD et LUQUET, 1994).

II-Classification des bactéries lactiques

En 1919, ORLA-JENSEN a séparé les bactéries lactiques en deux groupes : homofermentaire, qui réunit les bactéries formant très peu de métabolites autres que l'acide lactique, celui-ci représentant 90 à 97 % du lactose métabolisé ; et hétérofermentaire, qui réunit les bactéries formant du lactate, en proportion moindre, ainsi que des concentrations non négligeables de produits secondaires et du CO₂. Ces deux familles sont ensuite subdivisées en sous-familles selon des critères morphologiques et physiologiques (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

Dès 1974, selon le Bergey's manual (HOLT *et al.*, 1994), les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcaceae* et celle des *Lactobacillaceae*. En 1985, Schleifer *et al.* ont proposé la division des streptocoques en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les streptocoques lactiques (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

La classification des bactéries lactiques peut se faire aussi selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (VANDAMME, 1996 ; STILES et HOLZOPFEL, 1997 ; HO *et al.*, 2007).

Parmi les classifications proposées, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (DE AMBROSINI *et al.*, 1996), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C_{19:0}) et les acides gras insaturés (C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0}) qui la composent (GILAROVA *et al.*, 1994).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres

genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (COLLINS *et al.*, 1993 ; HO *et al.*, 2007).

Le tableau 02 présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification.

Tableau 2. Principaux genres de bactéries lactiques (MATAMOROS, 2008)

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb. divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaire	D(-), L(+) ou D/L	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Tc. halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	L(+)	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétérofermentaire	D/L ou D(-)	<i>We. viridescens</i>

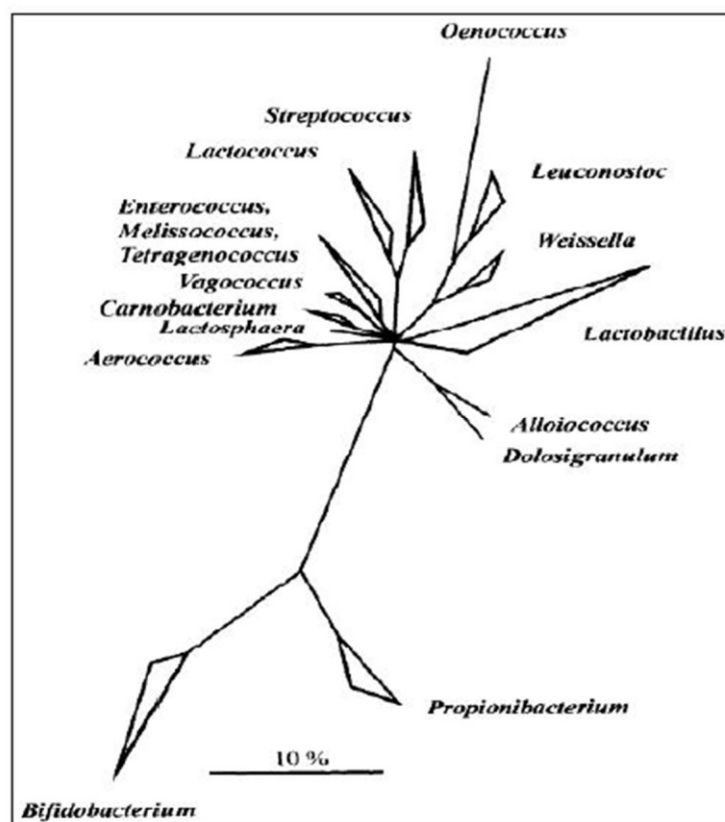


Figure 3. Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (STILES et HOLZAPFEL, 1997)

III- Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

III-1- Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (KHALID et MARTH, 1990 ; LECLERC *et al.*, 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par ORLA-JENSEN en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (TAMIME, 2002 ; GUIRAUD et ROSEC, 2004) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

III-2- Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (TAMIME, 2002).

Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (ZHANG et CAI, 2014).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (POT *et al.*, 1996 ; POT, 2008). Et Selon GUIRAUD (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. Lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. Lactis* ssp. *Lactis* et *Lc. diacetylactis*. La sous espèce *Streptococcus Lactis* ssp. *diacetylactis* est remplacée par la sous espèce *Lactococcus Lactis* ssp. *Lactis*.

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (DELLAGLIO *et al.*, 1994 ; CORROLER *et al.*, 1999). *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (CORROLER *et al.*, 1998 ; DALMASSO *et al.*, 2008).

III-3-Le genre *Streptococcus*

Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (SCHEILFER, 1987). Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2 µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables à se développer à 15°C et à pH: 9,6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (HADDIE, 1986 ; PILET *et al.*, 2005).

III-4-Le genre *Enterococcus*

Les *Enterococcus* représentent le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*). Ce genre comprend

des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes. Il se caractérise par sa tolérance à 6,5% de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C (ZHANG et CAI, 2014). Les entérocoques peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (TAMIME, 2002 ; HO *et al.*, 2007).

III-5-Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* ; bactéries lactiques typiques (LAB). Ils ressemblent le plus étroitement au genre *Lactobacillus*. Ils sont Gram positif, catalase négative et anaérobie facultatif. Le genre *Weissella* regroupe deux types morphologiquement différents: les bacilles (anciennement les lactobacilles hétérofermentaires "atypique") et les coques de forme ovoïde (*Leuconostocs*, *Oenococcus* et *Streptococcus* "typique"): *Weissella paramesenteroides* et *Weissella hellenica* (BJÖRKROTH et HOLZAPFEL, 2003).

Les caractéristiques physiologiques tels que l'absence de l'arginine déiminase, et la production prédominante du D (-) - lactate à partir du glucose, sont partagées par toutes les espèces du genre *Leuconostoc* et *Oenococcus*, et seulement par les espèces de *Weissella* ayant une forme ovoïde (*W. paramesenteroides*, *W. hellenica* et *W. thailandensis*) (HAMMES et VOGEL, 1995).

Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (HASSAN et FRANK, 2001 ; GUIRAUD, 2003 ; OGIER *et al.*, 2008).

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée du vin a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

III-6-Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces

se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (PILET *et al.*, 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (GUIRAUD et ROSEC, 2004 ; TOSUKHOWONG *et al.*, 2005).

III-7-Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (AXELSSON, 2004 ; PILET *et al.*, 2005 ; HO *et al.*, 2007).

III-8-Le genre *Vagococcus*

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (AMMOR *et al.*, 2006).

IV-Métabolisme des bactéries lactiques

IV-1-La glycolyse

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique

est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 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 CO₂ (BOURGEOIS *et al.*, 1996). La figure 04 présente les principales voies de la glycolyse chez les bactéries lactiques.

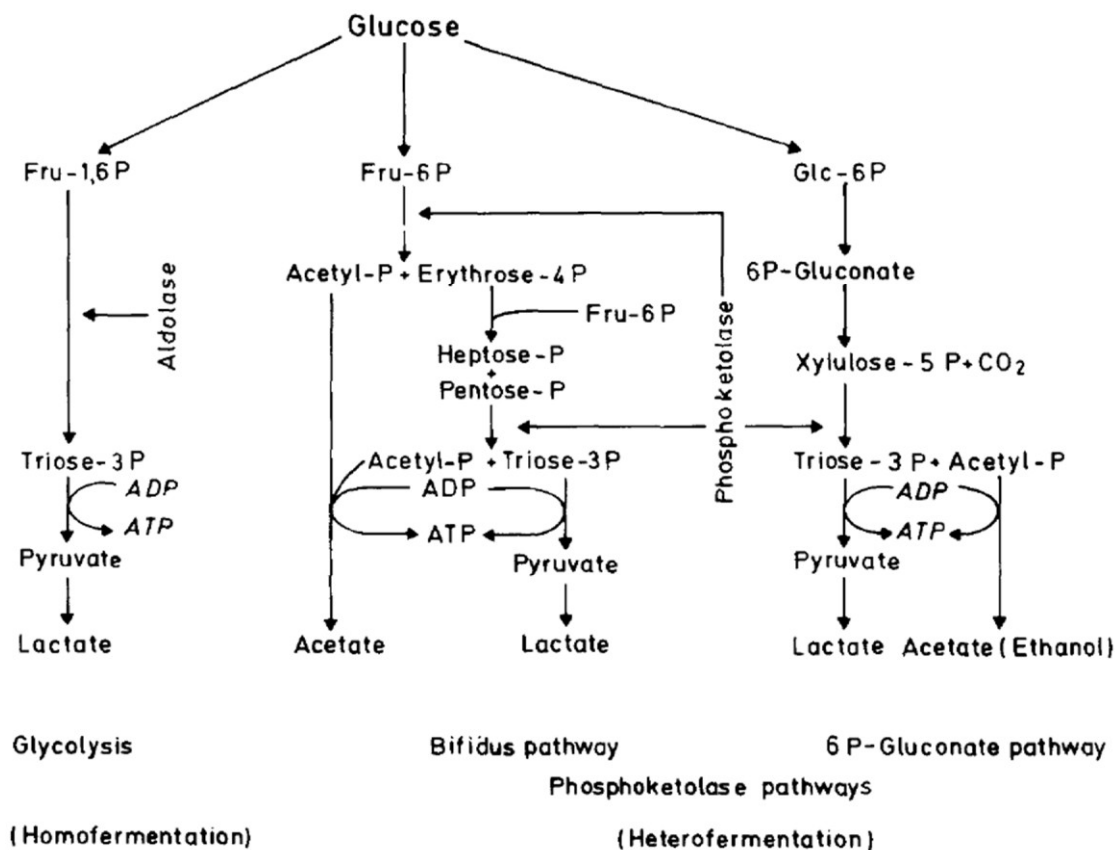


Figure 4. Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (KANDLER, 1983)

IV-2- La protéolyse

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). Ces systèmes sont complexes de par le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de par leur localisation cellulaire.

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (LAW et HAANDRIKMAN, 1997). La figure 05 représente la synthèse protéolytique chez les bactéries lactiques.

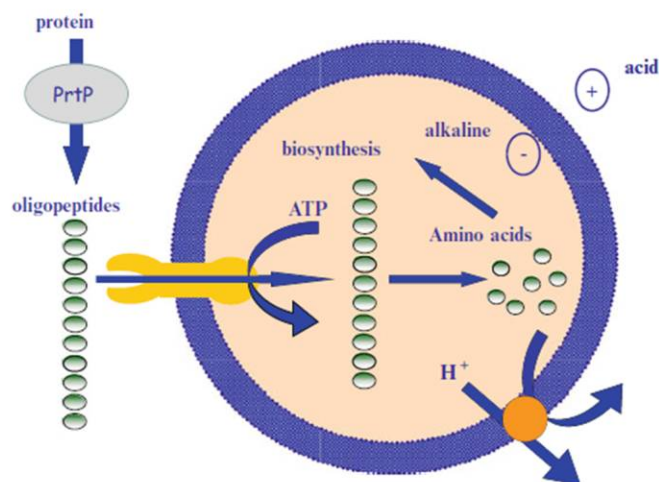


Figure 5. Système protéolytique des bactéries lactiques (KUNJI *et al.*, 1996)

IV-3- La lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la saveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters (SIEGUMFELDT *et al.*, 2000). La figure 06 présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés.

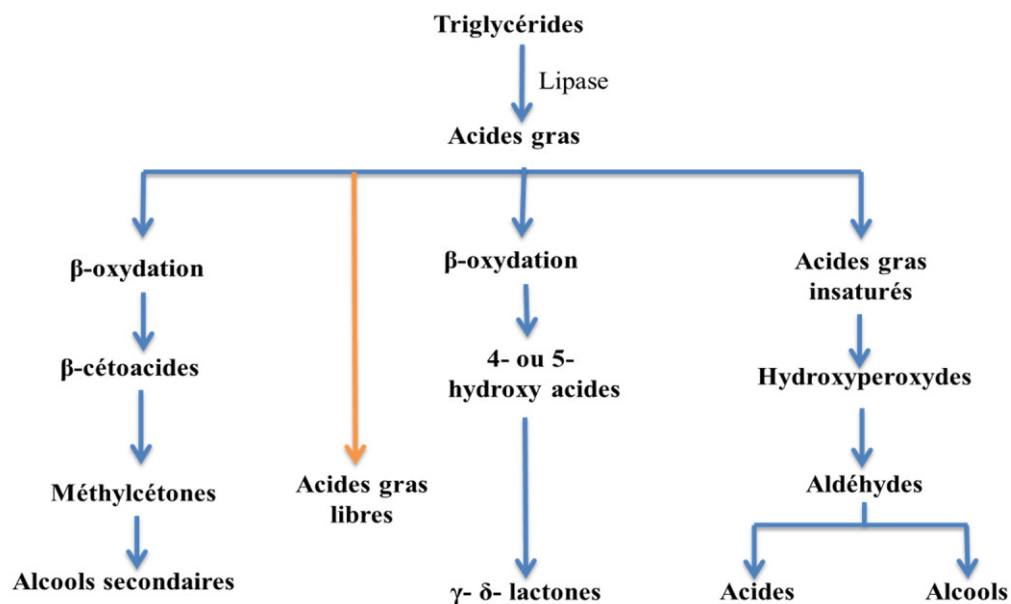


Figure 6. Principales voies de la lipolyse (SIEGUMFELDT *et al.*, 2000)

V-Intérêt des bactéries lactiques

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lipolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines (BELYAGOUBI, 2014).

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (MAKHLOUFI, 2011).

V-1-Domaine alimentaire

V-1-1-Pouvoir texturant

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (WELMAN et MADDOX, 2003 ; RUAS- MADIEDO *et al.*, 2002). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (DURLU-ÖZKAYA *et al.*, 2007 ; AMATAYAKUL *et al.*, 2006). L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2005).

V-1-2-Pouvoir aromatisant

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (TAMIME, 1990). La production de diacétyl est généralement associée à la fermentation du citrate (VIGNOLA, 2002). Les lactobacilles (*Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*) synthétisent de l'acétaldéhyde. La teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (VIGNOLA, 2002). Les *Leuconostocs* hétérofermentaires sont

souvent associés aux lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (MAHAUT *et al.*, 2000).

V-1-3-Pouvoir acidifiant

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

Afin de réaliser une caractérisation technologique des souches, il est utile de mesurer l'activité acidifiante des bactéries en reproduisant l'évolution thermique du fromage (CHAMBA et PROST, 1989). Pour mesurer l'activité acidifiante des bactéries dans le lait, la destruction préalable de la flore contaminante est nécessaire (CHAVARRI *et al.*, 1983).

L. lactis subsp. *lactis*, ssp. *cremoris* et biovar. *diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (CASALTA *et al.*, 1995 ; LAFARGE *et al.*, 2004).

V-1-4-Pouvoir protéolytique

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, 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 (LYNCH *et al.*, 1997; LANE et FOX, 1996; FARKYE *et al.*, 1995). Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (DONKOR *et al.*, 2007 ; MONNET *et al.*, 2008 ; ROUDJ *et al.*, 2009). Selon JEANSON (2000), 2 types de protéases agissant sur les caséines (protéines impliquées dans la coagulation du lait) sont synthétisées :

- **Type I** : protéolyse de la caséine β ,
- **Type II** : protéolyse des caséines β , α_1 et κ .

V-1-5-Pouvoir lipolytique

Les activités lipolytiques des micro-organismes sont importantes pendant la maturation du fromage, elles contribuent généralement au développement de saveur (ORTIZ DE APODACA *et al.*, 1993). ORDOFIEZ et ORTIZ DE APODACA (1977), ont observé que les lipases extracellulaires de plusieurs microcoques isolées du fromage étaient plus actives contre les acides gras à courte et longue chaîne estérifié aux triacylglycérols, et l'activité lipolytique intracellulaire était moins que celle extracellulaire.

STADHOUDERS et MULDER (1958), ont observé que certaines souches de microcoques ont hydrolysé la matière grasse du lait en crème dans les conditions du laboratoire, mais n'ont pas hydrolysé la graisse de fromage. Cependant, d'autres auteurs ont rapporté que l'utilisation des souches choisies de microcoques améliore la saveur du fromage (REITER *et al.*, 1967; SCHLEIFER et KLOOS, 1975).

V-1-6-Pouvoir antibactérien

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (CARIDI *et al.*, 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutéline, du diacétyle et des bactériocines (DORTU et THONART, 2009).

Le peroxyde d'hydrogène, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase ; son pouvoir oxydatif provoque l'oxydation des lipides et la libération des acides nucléiques (BLOCK, 1991). Le dioxyde de carbone, formé au cours de la fermentation hétérolactique, crée un environnement anaérobie qui s'avère toxique pour certains micro-organismes aérobies (EKLUND, 1984). Les acides organiques, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. En diffusant à travers les couches lipidiques de la membrane bactérienne, ils provoquent un abaissement du pH interne par libération de protons, déstabilisant ainsi le fonctionnement de la cellule bactérienne (BOOTH, 1985).

Certaines souches de bactéries lactiques produisent des bactériocines à spectre d'action plus ou moins large comme la nisine et la lactostrepcine produites par *Lc. lactis*, la diplosine par *Lc. cremoris*, la plantaricine par *Lb. plantarum*, la mesentérocine et la leucocine produites par *Ln. mesenteroides* (PIARD et DESMAZEAUD 1992 ; PIARD *et al.*, 1992 ; VANDENBERGH 1993 ; CORBIER *et al.*, 2001). La production de ces peptides biocides peut présenter un intérêt dans la lutte contre des bactéries à Gram positif d'altération ou pathogènes (EDIMA, 2007).

V-2-Domaine de la santé

Les bactéries lactiques forment actuellement un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits (KLAENHAMMER *et al.*, 2007). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines (B et K), acides aminés, composés organiques (acide lactique et acétique), enzymes (lactase) et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (SOOMRO *et al.*, 2002).

Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (KHAN et ANSARI, 2007). Les lactobacilles ont été incorporés dans des laits fermentés (HELLER, 2001 ; OLIVEIRA *et al.*, 2001), des fromages (GOMES et MALCATA, 1998 ; NAYRA *et al.*, 2002) et des glaces (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996). Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, l'inactivation de composés toxiques ainsi que la stimulation du système immunitaire; donc ces micro-organismes sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (NINANE *et al.*, 2009).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif des bactéries lactiques sur plusieurs types de diarrhées (MKRTCHYAN *et al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (EL-GHAISH *et al.*, 2011). UEHARA *et al.* (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

Partie II

Etude expérimentale

Partie II : Matériel et méthodes

I-Méthodologie générale

La partie expérimentale vise à l'étude des aptitudes technologiques de la flore lactique du fromage traditionnel *Bouhezza* après une caractérisation physicochimique et microbiologique de quatre échantillons de fromages de ferme destinés à la réalisation de ce travail.

Notre expérimentation se résume dans les étapes montrées dans la figure 7:

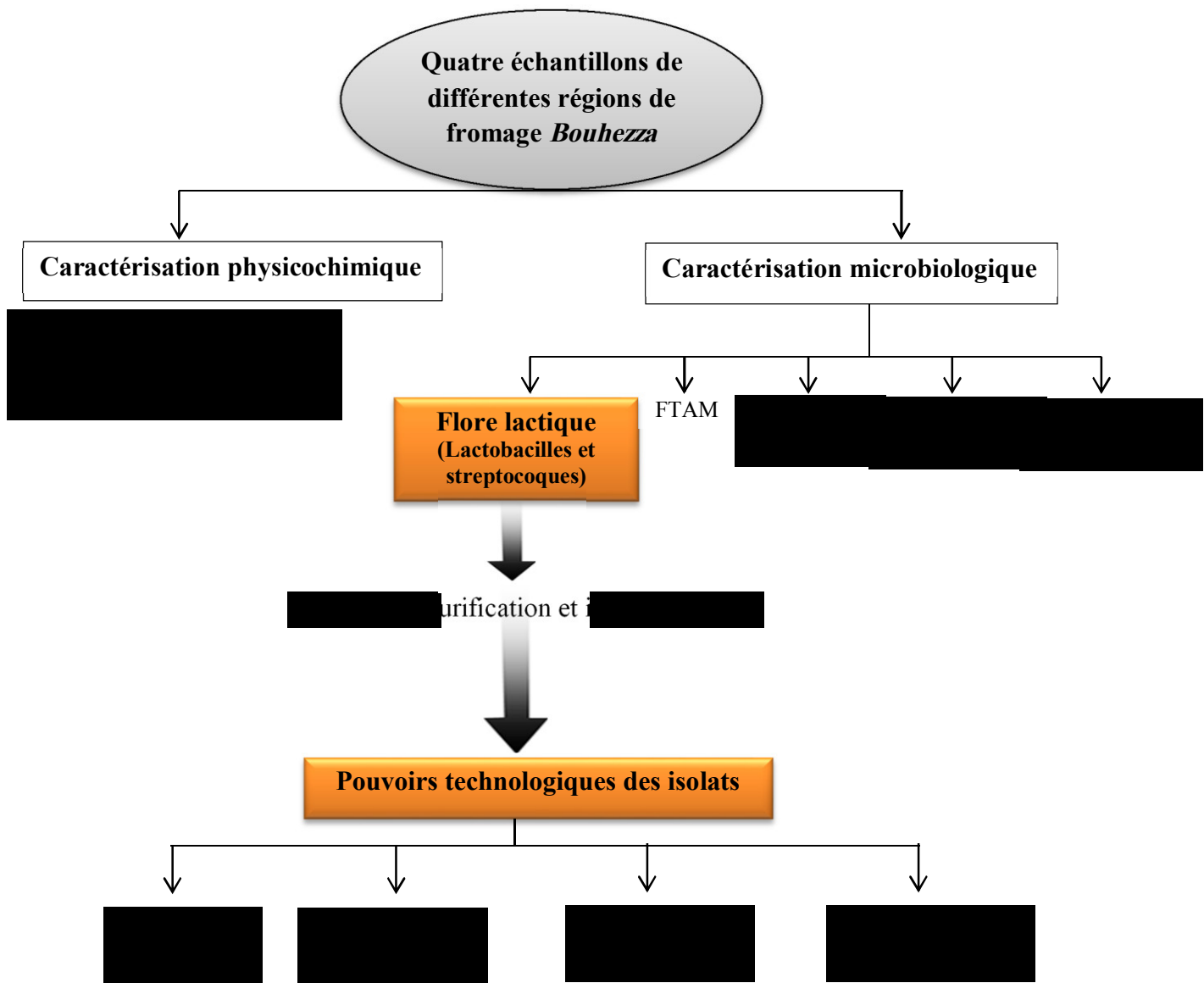


Figure 7. Méthodologie de l'étude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques de *Bouhezza*

La partie expérimentale de cette étude comprend principalement la caractérisation physicochimique des échantillons de *Bouhezza* collectés par la mesure de différents paramètres ; pH, acidité et extrait sec total ainsi que la caractérisation microbiologique par le dénombrement de la flore lactique, la flore totale aérobie mésophile (FTAM), la flore halotolérante, les levures et les moisissures et la recherche de la flore de contamination (coliformes totaux et fécaux, streptocoques fécaux et *Clostridium sulfitoréducteur*).

Le dénombrement de la flore lactique (lactobacilles et streptocoques) dans ce fromage permet l'isolement d'une collection de bactéries lactiques à partir d'un produit de terroir. La purification est réalisée grâce à des repiquages successifs afin d'avoir des isolats purs. L'identification de ces dernières est basée sur des examens microscopiques et des tests physiologiques et biochimiques; cela concerne la deuxième partie.

Dans l'étude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées, les pouvoirs technologiques recherchés sont :

- Le pouvoir acidifiant
- Le pouvoir protéolytique
- Le pouvoir aromatisant
- Le pouvoir antimicrobien

L'intégralité de ce travail a été réalisée au sein de l'équipe « Transformation et Elaboration des produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) du laboratoire de recherche en Nutrition et Technologies Alimentaires (L.N.T.A.) et aux laboratoires pédagogiques de l'INATAA.

II- Echantillonnage

Nous avons collecté quatre échantillons de fromage *bouhezza* de ferme fabriqués selon la méthode traditionnelle.

II-1- Origine des échantillons de fromage

Les échantillons sont collectés à partir des familles habitant deux régions rurales de la wilaya d'Oum El Bouaghi. Les échantillons ont été prélevés à partir des fermes dans des boîtes stériles. Ils ont été réfrigérés à 4°C puis transportés vers le laboratoire de Nutrition et de Technologies Alimentaires (LNTA). Le tableau 03 suivant résume l'ensemble des informations sur les échantillons de *Bouhezza* collectés.

Tableau 3. Echantillons de fromage *Bouhezza*

Echantillon	Commune d'origine	Age d'affinage
Ech f1	Henchir Toumghani	55 Jours
Ech f2	Henchir Toumghani	30 Jours
Ech f3	Ain Fakroun	30 Jours
Ech f4	Ain Fakroun	15 Jours

Les quatre échantillons de fromage *Bouhezza* étudiés sont fabriqués au lait cru de vache et dans des peaux de chèvre. Ces échantillons n'ont pas été épicés.

II-2- Diagramme de fabrication

A travers l'interview avec les fabricants de *Bouhezza*, qui sont en général des femmes au foyer. Le diagramme de fabrication est similaire à celui décrit par AISSAOUI ZITOUN (2014) (Ch. I partie IV-1-2).

La *Chekoua*, suspendue à l'ombre et à l'air libre, est remplie avec du *Lben* de vache salé 25 g/L, le niveau de remplissage de la *Chekoua* et la taille de celle-ci sont variables selon les familles. Au fur et à mesure qu'il y a égouttage de la *Chekoua*, des ajouts successifs de *Lben* sont effectués. La fréquence des ajouts est relative à la disponibilité de *Lben* et à la vitesse de l'égouttage (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011). Durant les derniers jours de la fabrication, des quantités de lait cru de vache sont ajoutées pour ajuster la salinité et l'acidité de fromage, puis le fromage est retiré de la *Chekoua* pour être préparé à la consommation.

Pour la plupart des familles, *Bouhezza* peut être assaisonné à la fin de sa fabrication par l'addition de piment piquant rouge pilé ou bien avec de *Hrissa*. Certaines familles préfèrent le consommer sans épices ; c'est le cas des échantillons de la présente étude.

III- Caractérisation physicochimique

Ces analyses reposent sur l'étude des paramètres suivants ; pH, acidité titrable et la teneur en matière sèche. Chaque essai est répété trois fois.

III-1-Détermination du pH et de l'acidité titrable

Les mesures de pH et de l'acidité titrable renseignent sur le niveau de production de l'acide lactique par les microorganismes lors de la préparation des laits fermentés et des fromages (NEVILLE et JENSEN, 1995). La quantité d'acide lactique produite dépend, d'une part, du type de bactérie utilisé et d'autre part de la quantité de lactose disponible (ST GELAIS *et al.*, 2000).

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. L'électrode du pH mètre est placée dans une suspension de fromage à 10 % (poids/volume) dans l'eau bidistillée (LENOIR, 1962).

L'acidité est déterminée dans le fromage par titrage avec une solution alcaline (NaOH, N/9). La présence de phénolphthaléine, comme indicateur coloré, indique la limite de la neutralisation par changement de couleur et virage au rose pâle. Cette acidité est exprimée en degré Dornic (°D).

L'expression des résultats est comme suit :

L'acidité titrable, exprimée en gramme d'acide lactique par cent grammes de fromage brut:

$$\text{Acidité titrable} = \frac{V_{\text{NaOH}} [\text{ml}] \times N [\text{mol/l}] \times 90,05 [\text{g/mol}]}{Z (\text{g})}$$

(g d'acide lactique /100 g fromage)

V : Volume en millilitre de la solution de titration NaOH

N : Normalité de la solution de titration (NaOH)

90.05 : Masse moléculaire de l'acide lactique (CH₃CHOCOOH), exprimé en gramme/mole

Z : Masse en gramme de l'échantillon

III-2-Détermination de la matière sèche

La matière sèche est l'un des paramètres les plus importants pour la caractérisation et la classification des fromages. Elle correspond au résidu sec obtenu après dessiccation dans l'étuve, à température égale à $100 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures (APHA, 2004).

Deux grammes de fromage *Bouhezza* sont pesés dans des coupelles après homogénéisation de la pâte fromagère, les prises des essais sont mesurées à 10^{-4} g près. La dessiccation est réalisée dans une étuve à circulation d'air forcée (MEMMERT) à une température de $100 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures.

L'expression des résultats est comme suit :

La matière sèche est exprimée en gramme par cent grammes du fromage brut:

Matière sèche (g/100 fromage brut) =

$$\frac{(\text{Coupelle} + \text{résidusec}(\text{g}) - \text{coupelle vide}) \pm \text{moyenne de essai à blanc}(\text{g})}{\text{coupelle} + \text{échantillon frais}(\text{g}) - \text{coupelle vide}(\text{g})}$$

IV- Caractérisation microbiologique

Les dilutions destinées à l'analyse sont réalisées à partir de la suspension mère de broyage préparée avec 10 g de fromage et 90 mL de diluant. Les fromages sont préférentiellement dilués à l'aide de citrate de sodium à 2%. Le diluant est chauffé à 45°C pour faciliter la dissolution du fromage (GUIRAUD, 2003).

A l'aide d'une pipette stérile 1 mL de la phase aqueuse est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile ; ainsi s'obtient la dilution 10^{-2} . Les dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-7} sont obtenues de la même manière.

Le nombre de colonies par boîte est évalué en UFC (unité formant colonie) par grammes d'échantillon selon la formule suivante (GUIRAUD, 2003) :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

N : Nombre d'UFC par grammes de produit initial.

Σc : Nombre de colonies comptées par boîte de Pétri.

n1, n2 : Nombre de boîtes de Pétri.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

IV-1- Dénombrement de la flore mésophile « totale »

Le dénombrement de la FTAM reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre l'évolution. Le nombre des germes « totaux » pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de l'état de décomposition du produit : il peut aussi dans certains cas constituer un indicateur de la qualité sanitaire (GUIRAUD, 2003).

L'isolement est réalisé sur gélose nutritive Plate Count Agar (PCA, Difco). Le milieu est ensemencé en profondeur et les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 h. Les dilutions utilisées sont 10^{-6} et 10^{-7} pour le fromage (GUIRAUD, 1998).

IV-2-Dénombrement des lactobacilles

Le milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharp) est utilisé pour la culture des lactobacilles (LEVEAU *et al.*, 1991). 0,1 mL d'inoculum est étalé à la surface du milieu. L'incubation se fait à 30°C pendant 48 h en anaérobiose en utilisant les dilutions 10^{-4} et 10^{-5} . Le pH du milieu MRS doit être fixé à 5,5 pour la sélection des lactobacilles.

IV-3- Dénombrement des streptocoques lactiques

Nous avons utilisé le milieu M17 (Difco) (LEVEAU *et al.*, 1991). L'ensemencement se fait en surface en utilisant les dilutions 10^{-4} et 10^{-5} avec incubation à 30°C pendant 3 jours.

IV-4- Dénombrement des halotolérants

La flore halotolérante est surtout intéressante par ses microcoques et *Brevibacterium linens*. Ces germes sont très protéolytiques et responsable également de la couleur orange à la surface de certains fromages (RICHARD et ZADI, 1983).

La culture est faite sur milieu hyper salé de Chapman (Difco) par ensemencement en surface à raison de 0,1 mL par boîte puis incubation à 37°C pendant 24 h.

IV-5-Dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Les coliformes totaux et fécaux sont dénombrés sur milieu DCL (Désoxycholate Citrate Lactose Agar). Ce dernier est ensemencé dans la masse à raison de 1 mL par boîte et incubé à 37°C et à 44°C pendant 24 h pour les coliformes totaux et fécaux respectivement.

Les colonies prises en considération sur ce milieu sont de couleur rouge foncée (HARAMI et HOFRI, 2006).

IV-6- Dénombrement de la flore fongique

La flore fongique comprend les levures et les moisissures. Leur présence peut être à l'origine des accidents de fabrication ou de défauts de quelques produits laitiers (GUIRAUD et GALZY, 1980). Elles participent à la maturation des fromages par leur pouvoirs protéolytique et lipolytique, (LENOIR, 1962 ; STARON, 1979 ; RICHARD et ZADI, 1983).

La flore fongique est cultivée sur milieu OGYE avec ajout de 100 mL/L d'oxytétracycline à 1 mg/mL. Le milieu est ensemencé en surface et incubé à 25°C pendant 3 à 5 jours. Toutes les colonies d'aspect lisse ou filamenteux sont comptées.

IV-7- Recherche de *Clostridium sulfito-réducteur*

A partir de chaque dilution de fromage, 5 mL sont prélevés aseptiquement dans un tube stérile. La sélection des formes sporulées est réalisée par chauffage de 10 min à 80°C pour détruire les formes végétatives (GUIRAUD et ROSEC, 2004), 0,5 mL d'une solution à 5 % de sulfite de sodium et 2 à 3 gouttes de solution de citrate de fer à 5 % sont ajoutées. Après agitation, les tubes sont refroidis à température ambiante et 7 mL de gélose viande foie (VF) (Institut Pasteur, Algérie) est ajouté pour assurer l'anaérobiose. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 h.

Les grosses colonies noires, produisant des sulfures à partir des sulfites qui ont précipité avec les ions de fer, sont considérées clostridies sulfito-réducteurs (DESMASURES *et al.*, 1997).

IV-8- Recherche des Streptocoques fécaux

Une culture présomptive avec des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} est effectuée sur milieu de Rothe (Institut Pasteur, Algérie) à 37°C pendant 48 h. Les contenus des tubes positifs, c'est-à-dire présentant un trouble, sont ensuite repiqués sur milieu Litsky avec une anse de platine et soumis à une incubation à 37 °C pendant 48 h (MAURY, 1987).

L'apparition d'un trouble homogène et celle d'une pastille violette au fond des tubes signent la présence de streptocoques fécaux.

V- Isolement et identification des bactéries lactiques du fromage traditionnel *Bouhezza*

V-1-Prélèvement des colonies isolées et purification

L'isolement par stries est réalisé sur gélose MRS et M17 préalablement coulées et solidifiées dans des boîtes de Pétri après dénombrement. Il s'effectue en prélevant des colonies bien isolées et apparaissant morphologiquement différentes. Ces colonies sont choisies après test de catalase et coloration de Gram (catalase⁻ et Gram⁺ pour les bactéries lactiques) et repiquées sur les milieux d'isolement. L'incubation est réalisée à 30°C et 37°C pendant 24 à 48 h (en conditions d'anaérobiose pour les lactobacilles).

L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (HELENI *et al.*, 2006).

V-2-Conservation des isolats

V-2-1- Conservation à court terme

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 h. Les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fait tous les trois semaines (SAIDI *et al.*, 2002).

V-2-2- Conservation à long terme

La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant 70 % de lait écrémé (enrichi par 0,05 % d'extrait de levure et 0,05 % de glucose) et 30% de glycérol et stockés à une température de -20°C (SAMELIS *et al.*, 1994 ; HERRERO *et al.*, 1996). Les mêmes isolats sont aussi mis dans le lait écrémé sans glycérol et incubés à 37°C jusqu'à coagulation puis conservés à -20°C.

La figure 08 résume les étapes d'isolement, de purification et de conservation des isolats de bactéries lactiques:

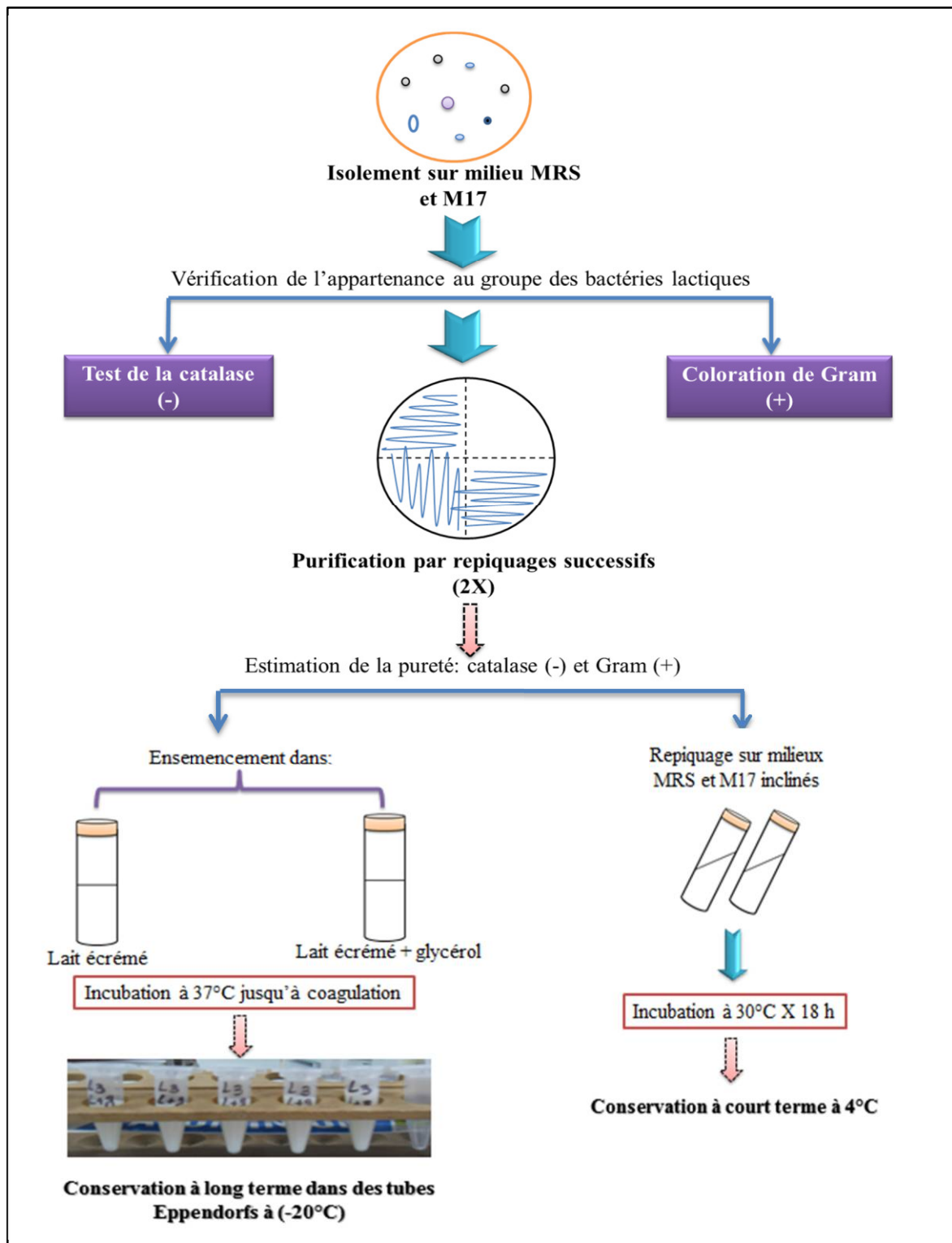


Figure 8. Isolement, purification et conservation des isolats de bactéries lactiques

VI- Identification des bactéries lactiques isolées

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

VI-1- Examen macroscopique et microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS et M17, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement après examen des cellules au microscope optique (x100).

Les images photos obtenues sont numérisées, stockées et analysées par traitement informatique en utilisant le logiciel Aphelion Lab 4.3.1 (32 bit version) (EVALUATION) et le logiciel Image J.

VI-2- Caractères physiologiques et biochimiques

VI-2-1-Test de la catalase

Pour différencier les lactocoques ou leuconostocs (catalase-) des entérocoques (catalase+) ; les lactocoques comme la majorité des bactéries lactiques sont des microaérophiles et n'ont pas besoin de synthétiser la peroxydase contrairement aux entérocoques qui sont aérobies. Le test consiste à verser une goutte de peroxyde d'hydrogène dilué au dixième, sur une lame de verre et d'y ajouter, à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie développée sur gélose MRS s'il y a effervescence l'activité de l'enzyme catalase est positive (Cat+). Le contraire est négatif (LARPENT et LARPENT, 1990).

VI-2-2-Mannitol-mobilité

Mettre en évidence l'attaque du mannitol par un changement de couleur de milieu et aussi la possibilité de mettre en évidence la mobilité du germe étudié. L'ensemencement se fait par piqure centrale avec un fil de platine. Après incubation à 30°C pendant 48 h, la mobilité du germe se traduit par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la piqure de l'inoculation (GUIRAUD, 2003).

VI-2-3-Température de croissance

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries thermophiles. Après inoculation en milieux liquides (bouillon MRS et M17) avec une culture pure d'organismes à tester, les tubes sont incubés 07 à 10 jours à 10°C et à 15°C et 24 à 48 h à 45°C. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux : présence de trouble.

VI-2-4-Thermorésistance

Des tubes contenant 10 mL de MRS liquide sont inoculés par les souches testées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble (ROUISSET et BENSOLTANE, 2006).

VI-2-5-Croissance en présence de NaCl

Ce test permet de distinguer les espèces sensibles aux variations de la pression osmotiques. Il permet de différencier les entérocoques des lactocoques et des leuconostocs. Chacun des milieux MRS et M17 est additionné de 6,5% de chlorure de sodium. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 02 à 03 jours. Nous avons utilisé aussi des milieux MRS et M17 à 4% de NaCl pour l'ensemble des souches.

VI-2-6-Culture à pH 9,6

Ce test permet de distinguer les souches qui se développent ou non en milieu basique. Les bouillons MRS et M17 sont ajustés à pH 9,6 et les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 h (GUIRAUD, 2003). Elle concerne les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, le pH 9,6 est obtenu par l'addition d'une solution de NaOH (1N).

VI-2-7-Production d'acétoïne

Pour réaliser ce test, du lait écrémé stérile (à 9%) a été réparti en tubes. Chaque tube reçoit une culture à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24 h et vérification de la coagulation, 5 gouttes des deux réactifs VPI et VPII ont été ajoutés à chaque tube positif, suivi d'une agitation intense. Après un délai de 10 min, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l'a-naphtol (VPI) en donnant un complexe rouge.

VI-2-8-Culture sur le lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène. Chaque culture à tester a étéensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3%. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait.

Le bleu de méthylène tire sa couleur grâce à l'oxygène, ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ce sont des microaérophiles, ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%) et de ce fait

la couleur du lait (bleue) ne virera que légèrement vers le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilisent tout l'oxygène du bleu de méthylène (LARPENT et LARPENT, 1990).

Seules certaines espèces appartenant genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer.

VI-2-9-Recherche de type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié a étéensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface.

L'incubation est faite à 37°C pendant 7 jours. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube (LARPENT, 1997).

VI-2-10-Métabolisme des hydrates de carbone

Ce test permet de mettre en évidence la fermentation des sucres par les souches, en utilisant le milieu MEVAG (pour l'étude de la voie d'attaque des glucides). A 90 mL de milieu, ajouter aseptiquement 10mL d'une solution stérile des hydrates de carbone : lactose, glucose, fructose, saccharose, mannitol à 10% puis répartir à raison de 10 mL par tube. Au moment de l'emploi, le milieu est régénéré au bain Mari. Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil de platine chargé d'une culture, puis ajouter l'huile de paraffine au-dessus du milieu. Porter les tubes à l'étuve à 37°C pendant 48 h ou plus. La production d'acide se manifeste par un virage au jaune (GUIRAUD, 2003).

Pour chaque milieu utilisé, un témoin sans sucreensemencé par la souche étudiée est utilisé. Ce test a été réalisé pour huit sucres : glucose, saccharose, lactose, D (+)-maltose, mannitol, dextrine blanche, D-mannose et D (+)-sucrose.

VI-2-11-Recherche de la β -galactosidase (ONPG)

L'enzyme β -galactosidase (β -gal) est présent pour catalyser le lactose en glucose et galactose; le mécanisme de transport du lactose n'a pas été totalement élucidé, un système de

force motrice protonique ayant été postulé pour *S. thermophilus* (POOLMAN, 1990; HUTKINS et PONNE, 1991); seulement *Lb. helveticus* (et peut-être certaines souches de *Lb. lactis*) peut métaboliser le galactose en utilisant la voie de Leloir (le galactose est phosphorylé au galactose-LP, transformé en glucose-LP, puis au glucose-6-P, puis il entre dans la voie de la glycolyse). Les bactéries lactiques thermophiles produisent également différents isomères du lactate (STANLEY, 1998).

Il s'agit d'une recherche particulière de la dégradation du lactose, souvent encore appelée recherche de la β -galactosidase ou communément test ONPG (ortho-nitrophényl- β -D galacto-pyranoside). Ce composé possède un radical β -galactosidique comme le lactose, il est incolore, une fois scindé par l'enzyme en question, il libère du galactose et de l'orthonitrophénol composé soluble jaunâtre.

Les souches sont mises en suspension dans des tubes contenant quelques gouttes d'eau physiologique, un disque d'ONPG est mis dans la suspension. La coloration jaune traduit l'hydrolyse d'ONPG après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h (GUIRAUD, 2003).

VI-2-12-Recherche de la citratase

Le citrate est une constituante 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. Toutefois, la concentration de citrate dans la phase aqueuse du fromage serait environ 3 fois celle du lactosérum, reflétant les concentrations de citrate colloïdal (AMMOR *et al.*, 2004). Chez les bactéries lactiques, *Leuconostoc* et *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* se distinguent par leur métabolisme fermentaire du citrate (Cit+).

La citratase a été mise en évidence par culture sur gélose semi solide au lait citraté. La gélose a étéensemencée en masse et incubée à 37°C pendant 3 à 5 jours. La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu, c'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et acétoïne.

VI-2-13-Recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)

Une culture de 24 h a étéensemencée dans le milieu Möeller à l'arginine. Puis l'ajout d'une couche de l'huile de vaseline stérile (1 mL) pour favoriser les conditions d'anaérobiose. La lecture s'effectue après 1 à 2 jours à 37°C ou 30°C.

L'arginine décarboxylase est mis en évidence par le changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune au bout de quelques heures (8-10 h) qui s'explique par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie, puis un virage vers le violet (après 24 h) qu'est due à la formation d'ammoniaque (réalcalinisation du milieu). Le tube témoin vire au jaune et garde la couleur (MÖELLER, 1955).

VI-2-14-Hydrolyse de l'amidon

L'hydrolyse de la gélatine par les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, est recherchée sur la gélose nutritive ordinaire additionnée de 0,3 % d'amidon soluble et caractérisée au lugol après trois jours d'incubation à 30 °C (GUIRAUD, 1998).

VI-2-15-Résistance au tellurite de potassium

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées de gélose à 0,4% de tellurite de potassium par les souches lactiques à tester. Après une période de 24 h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires (LARPENT, 1997).

VI-2-16-Production des exopolysaccharides

Les souches à tester ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifier. Après incubation à 37°C pendant 24 h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (LEVEAU *et al.*, 1991).

VII- Etude de l'aptitude technologique des bactéries lactiques isolées

VII-1- Pouvoir acidifiant

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

On commence par la préparation de lait écrémé à 10% dans des flacons de capacité 250mL. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon est ensemencé par une culture lactique (V/100V). Après incubation à 37°C, à un intervalle du temps 2 h, 6 h et 24 h; 10 mL du lait est prélevé puis titrer par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (LARPENT, 1997).

L'acidité est déterminée par la formule :

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

Où :

V NaOH: Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10 mL de lait. La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

VII-2- Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20 μ L d'une culture jeune. Après une incubation à 37° C pendant 24 h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (VEUILLEMARD, 1986).

VII-3- Production des composés aromatiques

La production d'acétoïne (acétylméthylcarbinol) est testée sur milieu Clark et Lubs. Les souches sont cultivées sur ce milieu; Après 24 h d'incubation, on test par la réaction de Voges- Proskauer dite réaction de VP (AVRIL *et al.*, 1992).

Dans un tube à hémolyse, 2 mL de cette culture sont transvasés, 0,5 mL d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP1) et 0,5 mL de réactif α -naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP2). On agite soigneusement les tubes et on laisse au repos 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylène glycolique (ZOURARI *et al.*, 1992 ; GUESSAS, 2006).

VII-4- Pouvoir antimicrobien

VIII-4-1-Souches pathogènes à tester

Cinq souches pathogènes ont été utilisées dans cette étude : une souche à gram négatif : *E. coli* (DH5) et quatre souches à gram positif : *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Listeria monocytogenes* ATCC, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* ATCC6633.

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 h) en phase de croissance exponentielle. Les étapes de la préparation des suspensions des souches pathogènes à partir des stocks sont les suivantes :

- Préparation de l'inoculum des souches pathogènes en prélevant 10 µL de chaque stock (conservé à - 20°C dans 50% glycérol). La quantité prélevée est répartie en stries sur gélose Muller Hinton et incubée à 37°C pendant 18 h. L'obtention de colonies uniformes et la coloration de Gram peuvent vérifier la pureté des souches.
- Enrichissement des souches par repiquage de 200 µL du stock dans 10 mL de bouillon nutritif suivi d'une agitation et incubation à 37°C pendant 18 h.
- Après incubation 250 µL sont prélevés du tube d'enrichissement et versées dans un flacon contenant 50 mL de bouillon nutritif. Après les avoir bien mélangé, nous obtenons la suspension bactérienne.

VII-4-2-Détection d'activité antimicrobienne

Les souches sont cultivées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant 18 h. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min) (BAREFOOT *et al.*, 1983). Le surnageant est récupéré soigneusement avec élimination des cellules bactériennes rassemblées en fond des tubes et conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

La méthode de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971) a été appliquée. Vingt ml de milieu MRS solide sont coulés dans des boîtes de Pétri. Sur cette couche, on dépose 8 mL de milieu contenant 0,8 % d'agar, et maintenu en surfusion à 45°C etensemencé par 100 µL d'une culture fraîche de la souche indicatrice.

Après solidification, de petits cylindres (moules en acier inoxydable) d'un diamètre de 6 mm vont nous permettre de confectionner des puits. Cent µL de surnageant sont déposés au niveau de chaque puits. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h et incubées à 30°C pendant 18 h. La présence d'une zone claire autour des colonies, indiquant l'absence de croissance de la souche test, et la zone d'inhibition est mesurée.

La nisine ; bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a été utilisée comme un témoin positif contre les bactéries Gram positif (dont *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*). La figure 09 résume les étapes de l'activité antibactérienne par la technique de diffusion en puits.

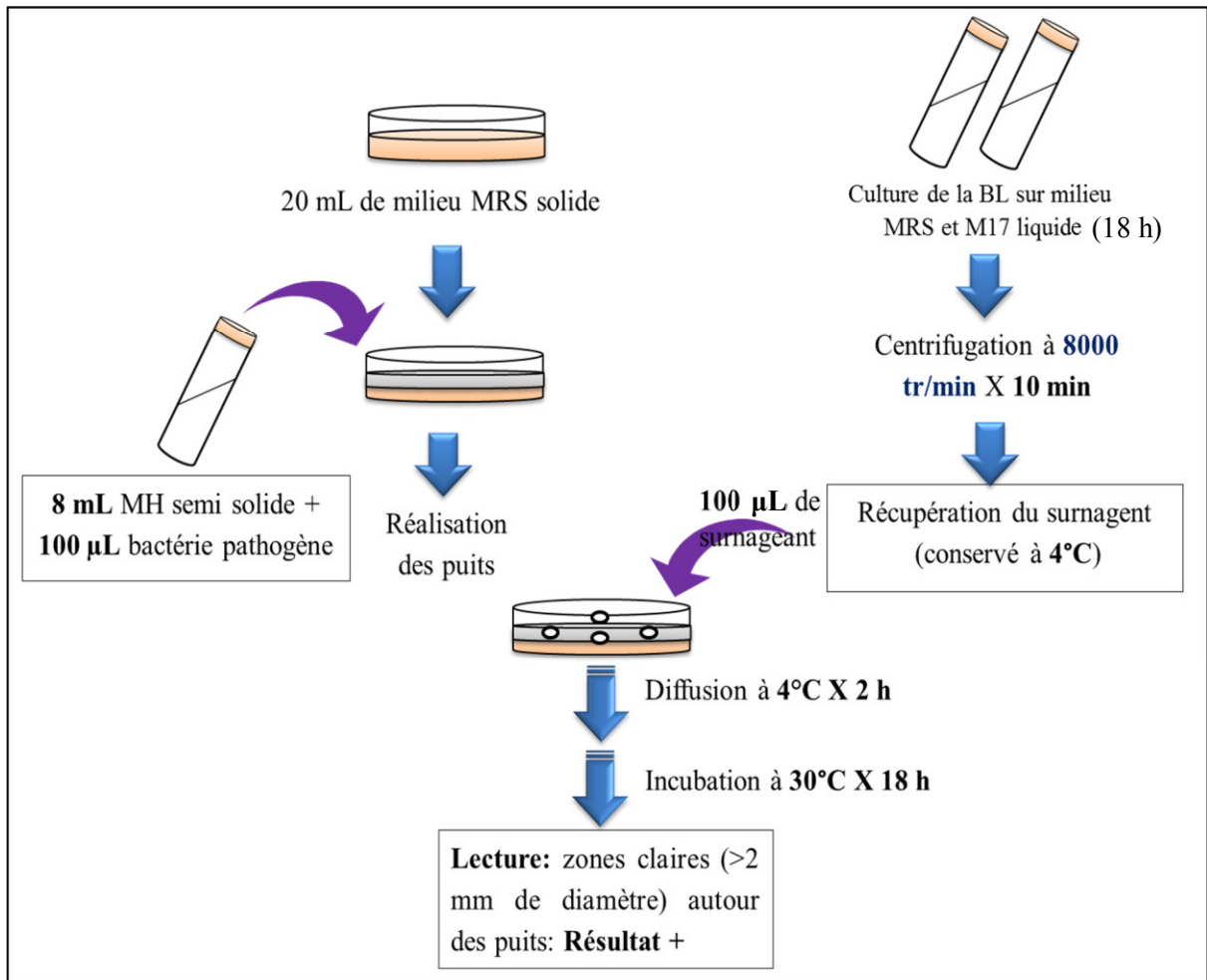


Figure 9. Mise en évidence du pouvoir antibactérien des LAB par la technique de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971)

Résultats

Et

Discussion

Partie III : Résultats et discussion

I-Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de fromage « *Bouhezza* »

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de *Bouhezza* sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 04) :

Tableau 4. Caractéristiques physicochimiques des échantillons de *Bouhezza*

Echantillons	pH	Acidité*	EST
Ech f1	3,81 ± 0,05	5,39	30,95 ± 0,60
Ech f2	3,79 ± 0,02	5,79	25,91 ± 0,10
Ech f3	4,32 ± 0,05	3,51	20,6 ± 0,28
Ech f4	3,83 ± 0,00	3,61	23,05 ± 0,28

*: g d'acide lactique par cent g de matière sèche.

Valeurs moyennes des trois essais (pH et extrait sec total).

I-1-pH et acidité titrable

D'après ces résultats, le pH du fromage traditionnel *Bouhezza* est compris entre $3,79 \pm 0,02$ et $4,32 \pm 0,05$. Ce résultat est similaire à celui signalé par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011). Selon ces auteurs, le pH de *Bouhezza* reste autour de 4 durant dix semaines d'affinage. BELBELDI (2013), a trouvé le même résultat pour des échantillons de *Bouhezza* de 30 jours d'affinage et des échantillons de fromage d'une durée d'affinage entre 45 et 120 jours (SAOUDI, 2012). Ces valeurs de pH sont dues à l'augmentation de la teneur en acide lactique produit par les bactéries lactique de *Bouhezza* durant sa fabrication.

Le pH de *Bouhezza* est légèrement inférieur au pH du fromage *Darfiyeh* fabriqué en Liban. Ce dernier a présenté des valeurs entre 4,87 et 4,92 à 40 jours d'affinage. Contrairement au fromage *Bouhezza*, le pH du fromage *Darfiyeh* augmente à la fin de l'affinage à des valeurs maximales aux alentours de 5 (SERHAN, 2008).

La teneur en acide lactique dans les échantillons de *Bouhezza*, est de 3,51 à 5,79 gramme pour cent gramme de *Bouhezza*, ces valeurs sont semblables à celles trouvées par SAOUDI (2012) et BELBELDI (2013). Cela est expliqué par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011) par l'augmentation significative de l'acide lactique dans le *Bouhezza* final et que le fromage *Bouhezza* ne permet pas le développement des bactéries qui dégradent l'acide lactique. En plus, les ajouts successives du *Lben* enrichi régulièrement le caillé en bactéries d'acidification lactique.

I-2-Extrait sec total

Les valeurs de l'extrait sec total se situent entre 20,4 et 30,25% pour les quatre échantillons, ces résultats sont très proches à ceux trouvés par AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011) et AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), qu'ils ont trouvés un extrait sec total de *Bouhezza* qui varie de 20,77 g/100 g durant la première semaine de fabrication à 35,86% vers la fin de l'affinage c'est-à-dire après dix semaines. Cette augmentation est probablement due aux additions régulières de *lben* et du lait cru et l'exsudation continue du sérum par les perforations naturelles de la *chekoua* qui permet l'augmentation de la masse fromagère (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011).

La différence en extrait sec total entre les échantillons peut être due à la variabilité de l'extrait sec de *Lben* utilisés pour la préparation des échantillons, la fréquence et la quantité des ajouts de *Lben* et la vitesse de l'égouttage. Cette dernière est en relation avec la qualité de la *Chekoua*. La vitesse est maximale si la *Chekoua* est utilisée pour la première fois (BELBELDI, 2013).

II-Caractéristiques microbiologiques des échantillons de fromage « *Bouhezza* »

Les résultats des analyses microbiologiques du fromage *Bouhezza* sont présentés dans le tableau 05:

Tableau 5. Evaluation quantitative des flores microbiennes des différents échantillons de « *Bouhezza* » fabriqué dans la peau de chèvre (en UFC/g de fromage)

Groupes bactériens	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Flore mésophile totale	1,63 .10 ⁹	1,10 .10 ⁸	9 .10 ⁶	6,85 .10 ⁸
Streptocoques lactiques	2,71 .10 ⁷	8,9 .10 ⁵	1,6 .10 ⁵	2,72 .10 ⁸
Lactobacilles	1,16 .10 ⁷	1,18 .10 ⁶	1,7 .10 ⁵	3 .10 ⁶
Flore halotolérante	00	00	00	00
Coliformes totaux	00	00	00	4 .10 ⁴
Coliformes fécaux	00	00	00	2,5 .10 ²
Levures et moisissures	8,4 .10 ⁴	3 .10 ⁵	2,75 .10 ⁵	4,1 .10 ⁵
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	00	00	00	00
Streptocoques fécaux	00	00	00	00

II-1- Dénombrement des principales flores

II-1-1- Flore aérobie mésophile totale

Bouhezza est un fromage typiquement fabriqué à partir de lait cru nonensemencé. Il assure cependant le développement d'une microflore très diversifiée et en bon nombre (AISSAOUI ZITOUN, 2014).

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale du fromage *Bouhezza* des fermes, cultivée sur le milieu PCA est élevé, avec des valeurs entre $9 \cdot 10^6$ et $1,63 \cdot 10^9$ UFC/g de fromage. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés par TOUATI (2008) pour des échantillons de fromage à 70 jours d'affinage. D'après AISSAOUI ZITOUN (2004), le produit fini a présenté une population de $1,2 \cdot 10^8$ UFC/g. AISSAOUI ZITOUN (2014) a signalé que La charge la plus faible est celle de *Bouhezza* le plus affiné (150 j).

Les travaux réalisés par SENOUSSI (2013) ont montré que le biofilm de la peau de chèvre (fraîche et sèche) analysé après contact avec le *Lben* montre une élévation de la charge microbienne totale (environ 10^6 UFC/300 cm²). Selon SERHAN (2008), le fromage *Darfiyeh* fabriqué dans la peau de chèvre a présenté un même intervalle en flore totale aérobie mésophile situant entre 10^6 et 10^9 UFC/g de fromage.

II-1-2- Streptocoques lactiques

Le dénombrement des streptocoques lactiques sur le milieu M17 a montré une charge variant entre $1,6 \cdot 10^5$ et $2,72 \cdot 10^8$ UFC/g de fromage. Ce résultat est similaire à celui trouvé par SAOUDI (2012) pour les streptocoques mésophiles. Selon AISSAOUI ZITOUN (2014), la microflore du fromage de ferme est formée essentiellement de bactéries lactiques : les streptocoques lactiques mésophiles (10^4 et 10^7 UFC/g) et les lactobacilles mésophiles (10^5 et 10^7 UFC/g). De même, dans les fromages d'expérimentations la présence de ces groupes bactériens est marquée par une charge variant entre 10^6 et 10^7 UFC/g.

Selon TOUATI (2008), la population de cette flore a atteint $4,36 \cdot 10^7$ UFC/g à 70 jours d'affinage, le même résultat a été trouvé par AISSAOUI ZITOUN (2004) pour un fromage *Bouhezza* de même durée d'affinage. AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011), ont montré que les lactocoques se développent différemment dans le fromage *Bouhezza* avec une charge se situant entre 10^5 et 10^6 UFC/g durant les sept premières semaines de fabrication, ce nombre a augmenté significativement à 10^7 UFC/g après ajout du lait de vache. Les ajouts successifs du *Lben* et du lait de vache enrichissent le fromage avec la flore lactique indigène.

D'après les résultats de BOURAYOU (2014), le fromage *Bouhezza* fabriqué dans les sacs en toile est caractérisé par un nombre de streptocoques lactiques entre $6,5 \cdot 10^5$ et $8,6 \cdot 10^7$ UFC/g. Ce nombre est légèrement inférieur à celui trouvé dans le *Bouhezza* fabriqué dans la peau, cette faible variation peut être expliquée par la charge initiale de la *Chekoua* après contact avec du *Lben* qui a présenté un taux de $6,8 \cdot 10^5$ UFC/g (SENOUSSI, 2013). Cette charge initiale de la *Chekoua* de fabrication permet d'enrichir le fromage avec les streptocoques lactiques.

II-1-3- Lactobacilles

Les numérations des lactobacilles dans les quatre échantillons de *Bouhezza* sont relativement importantes avec des valeurs entre $1,7 \cdot 10^5$ UFC/g et $1,16 \cdot 10^7$ UFC/g. Ces valeurs sont proches à celles des streptocoques lactiques. Selon AISAOUI ZITOUN (2004), la charge des lactobacilles dans le fromage *Bouhezza* va de $3 \cdot 10^6$ à $3 \cdot 10^8$ UFC/g de fromage.

TOUATI (2008) a observé une stabilité de cette flore dans la masse fromagère à une valeur de 10^6 UFC/g durant les quatre premières semaines de la fabrication. Au-delà de cette période, une faible progression à 10^7 a été remarquée et resté stable jusqu'au produit fini.

Dans le *Pannerone* ; fromage traditionnel Italien au lait cru de vache, la flore prédominante est la flore lactique et principalement les lactobacilles qui présentent une charge de 10^8 UFC/g et viennent après les coques avec 10^7 UFC/g (MUCCHETTI *et al.*, 2009).

D'après LITOPOULOU-TZANETAKI et TZANETAKIS (2011), les lactobacilles prédominent dans les fromages fabriqués en été ; au printemps les entérocoques sont les bactéries les plus abondantes. Cette flore est aussi prédominante dans le *Touloumissio* ; fromage traditionnel grec affiné et conservé dans des sacs de peau (Touloumia) avec une charge de 10^7 UFC/g.

Selon STANLEY (1998), les lactobacilles se développent lentement dans le lait, mais avec des niveaux moins dans les fromages. Elles peuvent atteindre 10^7 à 10^8 cellules/g dans les fromages de 2 à 3 mois d'affinage.

II-1-4- Flore halotolérante

La flore halotolérante est absente dans les quatre échantillons de *Bouhezza* analysés. AISSAOUI ZITOUN (2004) a trouvé une population de $3 \cdot 10^3$ UFC/g de fromage vers 70

jours d'affinage. Une charge de la flore halotolérante est restée en moyenne et durant toute la période de fabrication à 10^4 UFC/g signalé par TOUATI (2008).

Dans le fromage Tilsit (fromage suisse semi-dur), la flore halotolérante augmente de 10^4 à 10^9 UFC/g dans les trois premières semaines de maturation, pour se stabiliser dans les cinq semaines qui suivent (BERESFORD *et al.*, 2001).

L'absence de cette flore dans les échantillons analysés peut être expliquée par la sensibilité de cette flore à la congélation. D'après STANLEY, (1998), les halotolérants sont capables de se développer entre 10 et 20°C. Les activités lipolytiques sont produites essentiellement par les bactéries halotolérantes et la flore à Gram négatif (SABLÉ *et al.*, 1997).

La flore halotolérante peut se trouver dans la matrice des fromages durs, semi-durs et les fromages mûris aux moisissures. Des investigations récentes indiquent le rôle significatif de cette flore dans le processus de maturation du fromage. Des espèces possédant des activités protéolytiques et lipolytiques élevées ont été isolées. Les espèces trouvées généralement dans le fromage sont *Micrococcus caseolyticus*, *M. freudenreichii* et *M. varians* (STANLEY, 1998).

II-1-5- Levures et moisissures

Le nombre des levures et des moisissures dans les quatre échantillons de fromage était entre $8,4 \cdot 10^4$ UFC/g et $4,1 \cdot 10^5$ UFC/g. Ce nombre a été trouvé par AISSAOUI ZITOUN (2014) dans le *Bouhezza* de fermes, alors que celui d'expérimentations a présenté un nombre légèrement supérieur entre 10^5 et 10^6 UFC/g. SAOUDI (2012) a signalé que les échantillons les plus âgés (75 et 120 j) du fromage *Bouhezza* ont présenté une charge plus faible en moisissures que des échantillons de 45 j et 60 j.

Selon CARDOSO *et al.* (2015), le nombre des levures trouvées dans le fromage n'est pas influencé par les saisons mais plutôt par la durée de maturation. La flore fongique peut avoir un rôle important pour le développement de la saveur du fromage pendant la maturation en raison de la protéase, de la lipase et de l'activité du β - galactosidase qu'elle possède.

Les levures colonisent la surface du fromage à un stade précoce, ils sont capables de croître à 4% de sel, et ont une forte activité neutralisante grâce à leur capacité à métaboliser le lactate. Ils sont à la fois protéolytique et lipolytique et produisent une gamme de composants

volatils aromatisants, de peptides et des acides aminés. Les moisissures ne sont pas inhibées par la production d'acide dans les produits laitiers fermentés (STANLEY, 1998).

La diversité microbienne rencontrée à cœur et en surface des fromages naît de la diversité des flores dans les laits en relation avec les diversités des environnements de ferme, de fabrication et d'affinage. La contamination microbienne initiale du lait est évidemment une étape clef de la transformation fromagère, mais l'évolution des communautés et leurs activités au cours de la fabrication et de l'affinage devraient être mieux intégrées pour définir ce que peut être la "bonne diversité microbienne" d'une flore de lait (MONTEL *et al.*, 2003).

II-2- Flore de contamination et flore pathogène

Les coliformes totaux et fécaux étaient absents dans trois échantillons de fromage *Bouhezza* analysés. Le seul échantillon contenant les coliformes totaux et fécaux a présenté une charge de $4 \cdot 10^4$ et $2,5 \cdot 10^2$ UFC/g respectivement. Ces résultats sont largement mineurs par comparaison avec ceux d'AISSAOUI ZITOUN (2004), qui a signalé une évolution entre 10^3 et 10^6 UFC/g, alors que SAOUDI (2012) a trouvé une charge en coliformes totaux et fécaux moins de 10 UFC/g.

Selon les résultats de TOUATI (2008), dans le fromage *Bouhezza* de fabrication, la charge en coliformes fécaux est d'environ 10^2 UFC/g, et après 50 jours d'affinage, leur nombre est réduit à moins de 10 UFC/g. AISSAOUI ZITOUN (2014), a signalé que le nombre des coliformes totaux dans les fromages de fermes, est de l'ordre de 10^2 UFC/g et dans ceux d'expérimentations est entre 10^4 et 10^5 UFC/g et que les charges des coliformes fécaux sont plus faibles, <10 UFC/g dans les fromages de fermes et de 10^2 à <10 UFC/g dans les fromages d'expérimentations de 28 à 70 j de fabrication.

Dans le fromage frais traditionnel marocain (*jben*) fabriqué à partir du lait cru, la flore d'origine fécale (coliformes totaux et fécaux) est plus importante dans les fromages commercialisés et en moyenne respectives de $1,04 \cdot 10^3$ UFC/g et $5,7 \cdot 10^4$ UFC/g (RHIAT *et al.*, 2011).

Une étude menée par HAJJ SEMAAN *et al.* (2011), a montré que 25% des fromages libanais traditionnels sont contaminés par des coliformes fécaux et d'*E. coli*, présentant des valeurs entre 10^2 UFC/mL et $33,88 \cdot 10^3$ UFC/mL d'*E. coli*, les classant inconsommables. Cinquante-huit pourcent des échantillons collectés montrent des contaminations par des streptocoques fécaux avec des valeurs entre 50 UFC/mL et $528 \cdot 10^3$ UFC/mL.

Selon AISSAOUI ZITOUN (2004), la charge élevée en coliformes totaux dans le fromage *Bouhezza* de fabrication a été expliquée par la qualité microbiologique du *Lben* de fabrication utilisé, qui contient environ $8 \cdot 10^6$ UFC/g des coliformes totaux, mais après quatre jours de fabrication cette flore a été réduite jusqu'à 10^3 UFC/g. Cette diminution est expliquée par la réduction de pH et le salage de la masse fromagère. L'étude de SENOUSSE (2013) sur la peau de chèvre, a confirmé l'absence totale d'entérobactéries dans le biofilm de la peau destiné à la fabrication de fromage *Bouhezza* après contact avec le *Lben*.

SAOUDI (2012), a expliqué la charge très faible en coliformes totaux et fécaux dans six échantillons de fromage *Bouhezza*, par la faible charge microbiologique de *Lben* de fabrication, et l'effet des conditions physicochimiques de la masse fromagère (principalement le pH et le taux de sel).

Cette étude a montré aussi l'absence de *Clostridium sulfito- réducteur* et des streptocoques fécaux dans les quatre échantillons de *Bouhezza*. Les travaux réalisés par SAOUDI (2012) ont montré l'absence égale de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, et *Escherichia coli O157: H7* dans des échantillons de *Bouhezza* des fermes par le système BAX®. Ces résultats ont été confirmés par AISSAOUI ZITOUN (2014) avec une absence égale de *S. aureus*.

Selon les résultats de MEDJOUJ ¹ (en cours), l'analyse par système BAX® de trois fabrications de *Bouhezza* au lait cru de chèvre, avec une durée de maturation de 50 jours pour deux d'entre elles et de 72 jours pour la troisième fabrication, et de deux échantillons de ferme (Tébessa et Ain Fakroun) a démontrée l'absence des trois bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli O157: H7*). L'analyse microbiologique de la *Chekoua* avant et après contact avec le *Lben* a montré l'absence de moisissures, d'entérobactéries et de *S. aureus* (SENOUSSE, 2013).

La faible charge des coliformes fécaux et l'absence de la flore pathogène dans le *Bouhezza* affiné est un résultat important dans la qualité hygiénique du fromage, vu l'utilisation du lait cru et de la peau de chèvre comme contenant, pendant plusieurs semaines. La qualité du fromage dépend principalement de la qualité du *Lben* et de lait cru utilisés (AISSAOUI ZITOUN, 2014). Cela peut être du de l'acidité de ce fromage, de la salinité et de la présence de la flore lactique productrice de substances antimicrobiennes.

¹Thèse de doctorat en cours.

III- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du fromage traditionnel

Bouhezza

III-1- Examen macroscopique et microscopique

III-1-1- Caractérisation macroscopique

Un total de trente-six souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS et M17. La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides MRS et M17 après 72 h d'incubation à 30°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité). Les caractères des colonies se diffèrent d'une souche à une autre (tableau 6).

Les colonies des streptocoques ensemencés sur le milieu M17 présentent un aspect lisse, de taille inférieure à celle des lactobacilles et un pourtour régulier (figure 10). Les colonies des lactobacilles sont blanchâtres et crémeuses à l'exception de quelques une qui sont gluantes. La caractérisation physiologique et physicochimique n'a été réalisée que pour 19 isolats.

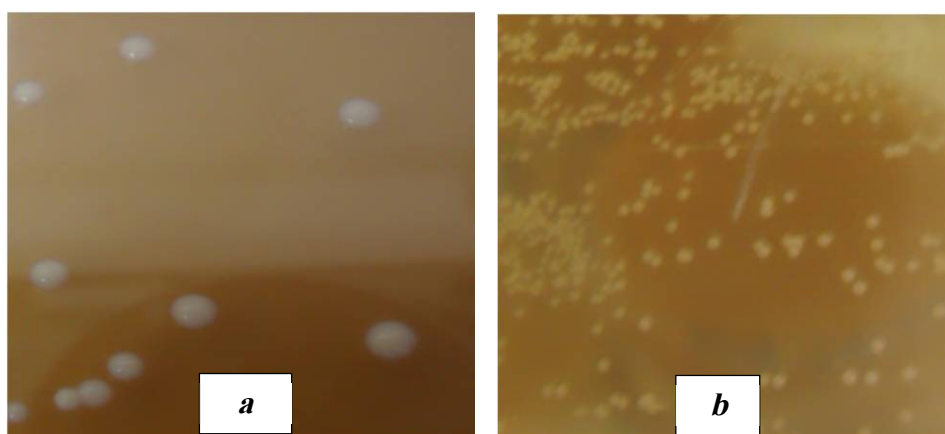


Figure 10. Aspect circulaire de couleur blanche des colonies des lactobacilles (a) et des streptocoques lactiques (b) sur les milieux MRS et M17 solides après incubation à 30°C pendant 48 heures

Tableau 6. Résumé de l'observation macroscopique des souches isolées du fromage traditionnel *Bouhezza*

Code	Forme	Couleur	Pourtour	Aspect	Viscosité
L1	circulaire	blanchâtre	Régulier	Lisse	crémeuse
L2	circulaire	Blanchâtre	Régulier	Lisse	gluante
L3	circulaire	Blanchâtre	Régulier	Lisse	crémeuse
L4	circulaire	Blanchâtre	Régulier	Lisse	crémeuse
L5	circulaire	Blanchâtre	Régulier	Lisse	gluante
L6	circulaire	Blanchâtre	Régulier	Lisse	gluante
L7	circulaire et bombée	Blanchâtre	Régulier	Lisse	gluante
L8	circulaire	blanchâtre	Régulier	lisse	gluante
S1	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S2	circulaire	Crème	Régulier	lisse	gluante
S3	circulaire	Crème	Régulier	lisse	gluante
S4	circulaire	Crème	Régulier	lisse	gluante
S5	circulaire	Blanche	Régulier	lisse	crémeuse
S6	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S7	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S8	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S9	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S10	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse
S11	circulaire	Crème	Régulier	lisse	crémeuse

III-1-2- Caractérisation microscopique

L'observation microscopique a révélé plusieurs formes de cellules ; cocci, bacilles de différentes tailles et ovoïdes. Ces formes sont disposées en paire, en grappe ou en chainettes plus ou moins longues. La coloration de Gram a montré que tous les isolats sont de Gram positif (Figure 11) et le test de catalase était négatif. Ces caractéristiques permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques. Les résultats de la caractérisation microscopiques sont résumés dans le tableau 07.

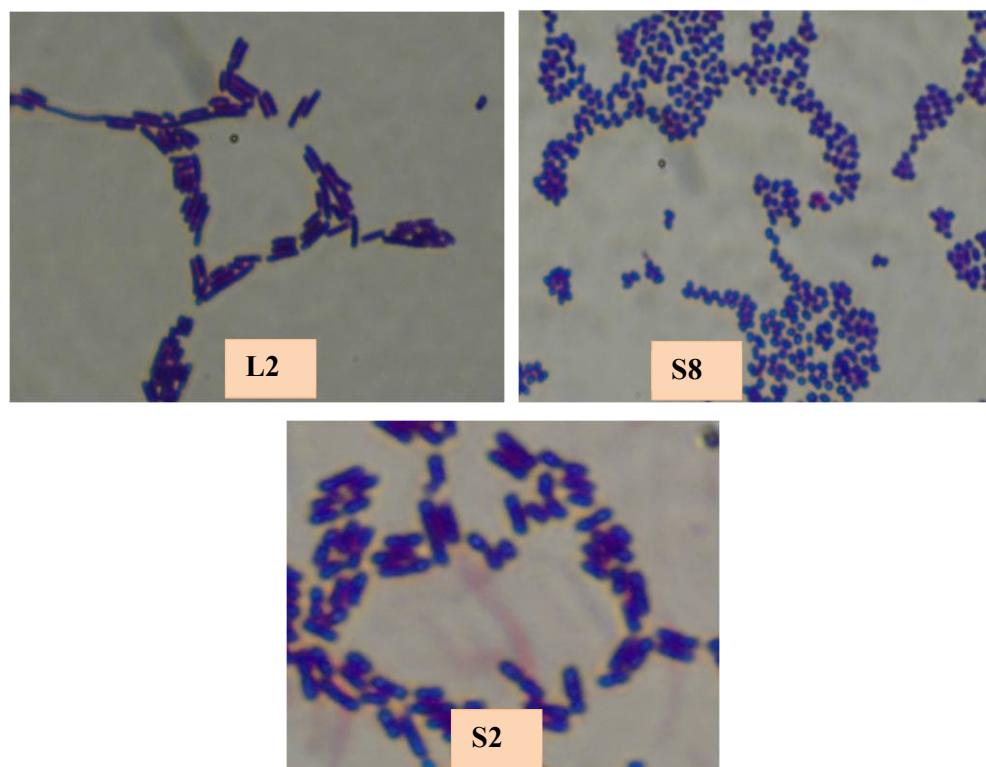


Figure 11. Aspect morphologique cellulaire des cultures pures des isolats (L2, S8 et S2) appartenant au lactobacilles et lactocoques (x100)

Tableau 7. Critères morphologiques, le gram et le test de la catalase des isolats présumés des bactéries lactiques isolées du fromage traditionnel *Bouhezza*

Souches	Gram	Catalase	Forme	Mode d'association
L1	+	-	Bâtonnets courts	En chaine et en diplobacilles
L2	+	-	Bâtonnets longs	Isolées, en amas et en chaînettes
L3	+	-	Bâtonnets	Isolées, en chaine et en amas
L4	+	-	Bâtonnets courts	Isolées et en amas
L5	+	-	Bâtonnets courts	En diplobacilles et en amas
L6	+	-	Bâtonnets courts	En amas
L7	+	-	Bâtonnets longs	Isolées, en chaine et en amas
L8	+	-	Ovoïdes	Isolées, en chaine et en amas
S1	+	-	Ovoïdes	En amas et en chainettes
S2	+	-	Ovoïdes	Diplocoques, en amas et en chainettes
S3	+	-	Ovoïdes	Diplocoques, en amas et en chainettes
S4	+	-	Coques	Diplocoques, en amas et en chaines

S5	+	-	Coques	En chaine
S6	+	-	Ovoïdes	En amas et en chainettes
S7	+	-	Coques	Diplocoques et en chaînes
S8	+	-	Coques	En grappe
S9	+	-	Coques	Diplocoques, en chainettes et isolées
S10	+	-	Coques	En grappes et isolées
S11	+	-	Ovoïdes	En amas et en chainettes

III-2-Tests physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats sont présentées dans les tableaux ci-après.

III-2-1- Type fermentaire des isolats et recherche de différentes enzymes

Le type fermentaire permet d'apprécier le type du métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé pour différencier entre les souches homofermentaires et hétérofermentaires en utilisant le milieu Gibson et Abdelmalek.

Les résultats montrent que la production de gaz (CO₂) à partir du glucose a été observée chez les souches : S2, S4, S6 et S9 pour les lactocoques isolées et L1, L2, L4, L5, L6 et L8 pour les lactobacilles. Ces isolats sont considérés comme hétérofermentaires. La production de gaz a été observée par une séparation du milieu de culture dans les tubes. Le reste des souches : S1, S3, S5, S7, S8, S10, S11, L3, et L7 sont considérés comme homofermentaires.

L'activité de l'arginine déshydrogénase effectuée sur les 19 souches, sur milieu Möeller à arginine a révélé que seules les souches : S7, S8 et S10 sont ADH positive (figure 12). La production de CO₂ à partir du citrate a été observée chez les souches L2 et S2 ce qui montre la présence d'enzyme citratase synthétisée par les deux souches (tableau 8).

D'après MC SWEENEY et SOUSA, (2000), l'utilisation du citrate mène à la formation du diacétyle, qui est un composant important de la saveur des produits laitiers, et d'autres composés tels que l'acétate, l'acétoïne et le 2,3-butanediol.

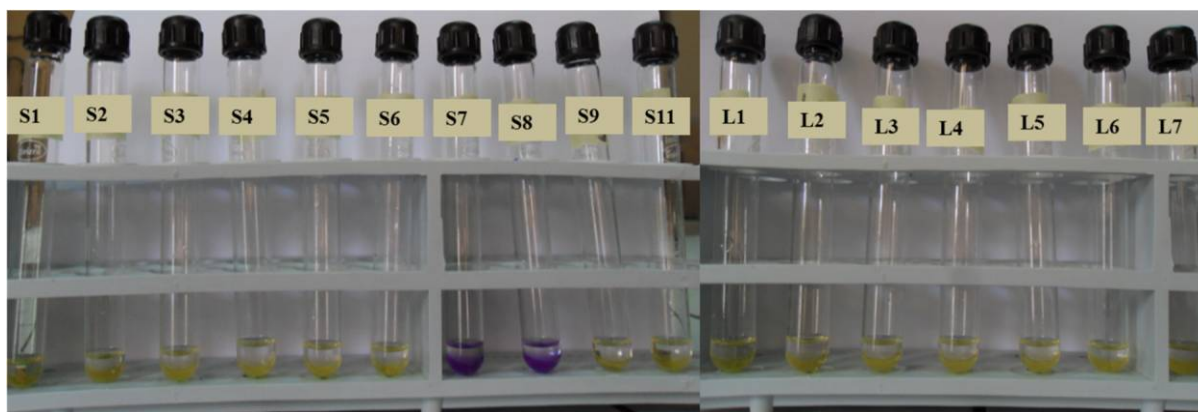


Figure 12: Test de l'ADH des isolats sur milieu Mœller à l'arginine

Tableau 8. Type fermentaire des isolats et recherche de différentes enzymes

Souches	Type fermentaire	ADH	β -galactosidase	Hydrolyse de l'amidon	Cit	Acét
L1	Hét	-	-	-	-	+
L2	Hét	-	+	-	+	+
L3	Hom	-	-	-	-	+
L4	Hét	-	+	-	-	+
L5	Hét	-	-	-	-	+
L6	Hét	-	+	-	-	+
L7	Hom	-	+	-	-	+
L8	Hét	-	+	-	-	+
S1	Hom	-	+	-	-	-
S2	Hét	-	+	+	+	-
S3	Hom	-	+	-	-	±
S4	Hét	-	+	-	-	-
S5	Hét	-	+	-	-	±
S6	Hét	-	+	-	-	±
S7	Hom	+	+	-	-	±
S8	Hom	+	+	-	-	±
S9	Hét	-	+	-	-	++
S10	Hom	+	+	+	-	±
S11	Hom	-	+	+	-	-

+ : test positif ; - : test négatif ; ± : résultat intermédiaire ; ND : Non déterminé, Cit : citratase, Acét : acétoïne.

III-2-2- Croissance à différentes températures et thermorésistance

L'emploi de ce test permet de diviser les souches en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupes des souches thermophiles. La croissance des isolats a été testée à 10, 15 et 45°C pour les lactobacilles et à 10 et 45°C pour les lactocoques.

Dans cette étude, la majorité des souches testées sont signalées thermophiles, elles poussent bien à 45°C après 24 h d'incubation sauf les souches : L2, L4, L6, S4, S6, S9 et S11 qui sont incapables à se développer à 45°C (type mésophiles).

Tous les isolats ont résisté à un traitement thermique au bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes. Selon TAILLIEZ, (2004), la plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C.

Tableau 9. Croissance à différentes températures et thermorésistance des isolats retenus

Souches	Culture à 10°C	Culture à 15°C	Culture à 45°C		Thermorésistance (63,5°C)
L1	+	+	+	Thermophile	+
L2	+	+	-	Mésophile	+
L3	+	+	±	Thermophile	+
L4	+	+	-	Mésophile	+
L5	+	+	+	Thermophile	+
L6	+	+	-	Mésophile	+
L7	+	+	+	Thermophile	+
L8	+	ND	+	Thermophile	+
S1	+	ND	+	Thermophile	+
S2	+	ND	±	Thermophile	+
S3	+	ND	+	Thermophile	+
S4	+	ND	-	Mésophile	+
S5	+	ND	+	Thermophile	+
S6	+	ND	-	Thermophile	+
S7	+	ND	+	Thermophile	+
S8	+	ND	+	Thermophile	+
S9	+	ND	-	Thermophile	+
S10	+	ND	+	Thermophile	+

S11	+	ND	-	Mésophile	+
+ : test positif ; - : test négatif ; ND : non déterminant ; ± : résultat intermédiaire.					

III-2-3- Croissance aux différentes conditions de culture

Les souches isolées ont été cultivées sur plusieurs milieux afin de tester leur résistance aux différentes conditions de culture (tableau 10).

La culture des lactocoques sur le bleu de Sherman à des concentrations de 0,1 et 0,3%, a montré le développement à 0,1% des souches S8 et S10, leur capacité à se développer en utilisant l'oxygène du bleu de méthylène permet à ce dernier de perdre son couleur. Un résultat négatif a été observé pour le reste des souches à une concentration de 0,1 et 0,3% bleu de méthylène (figure 13 et 14).

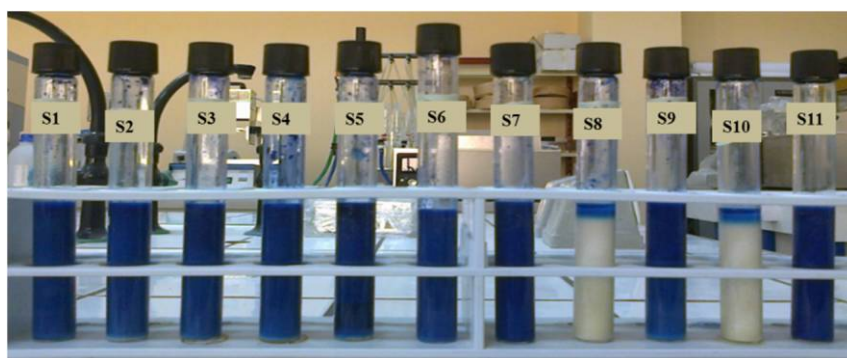


Figure 13. Test de croissance des coques isolées sur 0,1% bleu de Sherman

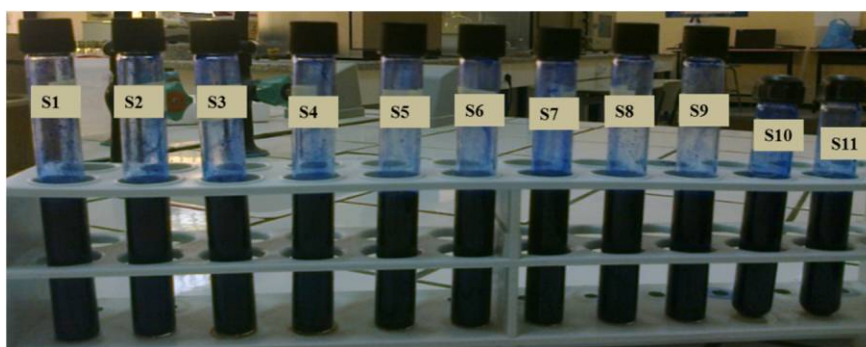


Figure 14. Test de croissance des coques isolées sur 0,3% bleu de Sherman

Toutes les souches sont testées sur gélose hypersaccharosée. La production des exopolysaccharides est présentée par l'apparition de colonies larges et gluantes. Cela a été essentiellement observé chez les souches S2, S3 et S9 montrés dans la figure 15. D'après PATEL *et al.* (2012), les fromages fabriqués par utilisation de cultures productrices d'EPS

deviennent lisses, crémeuses, humides et doux tandis que ceux fabriqués sans ajout de souches productrices d'EPS se trouvent sec et granuleux.

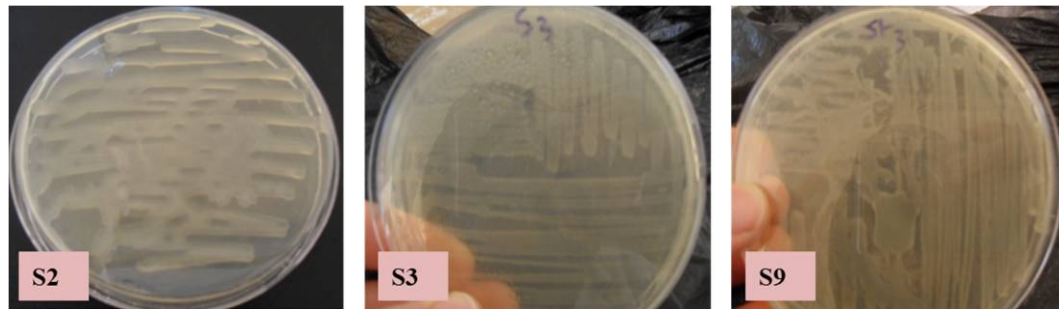


Figure 15. Aspect des souches S2, S3, S9, L3 et L6 sur gélose hypersaccharosée

Tableau 10. Tests de la résistance des souches isolées à différentes conditions de culture

Souches	lait de Scherman		Croissance sur NaCl		Croissance à pH 9,6	Résistance au tellurite de K	Production d'EPS
	0,1%	0,3%	4,5%	6%			
L1	-	-	+	+	+	-	+
L2	-	-	+	+	+	-	-
L3	-	-	+	+	+	-	±
L4	-	-	+	+	+	-	-
L5	-	-	+	+	+	-	±
L6	-	-	+	+	+	-	±
L7	-	-	+	+	+	-	-
L8	-	-	+	+	+	-	-
S1	-	-	+	+	+	-	±
S2	-	-	-	+	+	-	++
S3	-	-	+	+	+	-	+
S4	-	-	+	+	+	-	+
S5	-	-	+	+	+	-	-
S6	-	-	+	-	+	-	±
S7	-	-	+	+	-	-	±
S8	+	-	+	+	-	-	-
S9	-	-	+	+	-	-	±
S10	+	-	+	-	-	-	-
S11	-	-	+	-	-	-	-

+ : test positif ; - : test négatif ; ± : résultat intermédiaire

III-2-3- Profil fermentaire

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. Le résultat du profil fermentaire révèle une diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus (tableau 11).

Tableau 11. Profil fermentaire des souches isolées

Sucres Souches	Glucose	Saccharose	Mannitol	D (+)- Sucrose	D (+)- Maltose	Lactose	D-Mannose	Dextrine Blanche
L1	+	+	+	+	+	+	+	+
L2	+	+	+	+	+	+	+	+
L3	+	-	+	+	+	+	+	+
L4	+	+	+	+	+	+	+	+
L5	+	+	+	+	+	+	+	+
L6	+	+	+	+	+	+	+	+
L7	+	-	+	+	+	+	+	+
L8	+	+	+	+	+	+	+	+
S1	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	-	-	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	+	+	+
S4	+	+	+	+	+	+	+	+
S5	+	+	-	+	-	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+	+	+
S7	+	-	-	+	+	+	+	+
S8	+	-	-	+	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	+	+	+	+
S10	+	-	-	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+	+	+	+
+ : test positif ; - : test négatif.								

La différenciation entre les espèces repose sur la base des différentes températures de croissance, de l'hydrolyse de l'arginine, le type fermentaire et essentiellement sur leur faculté

à fermenter différemment les carbohydrates (Tableau 11). Les isolats de bactéries lactiques appartiennent aux groupes suivants :

➤ **Coques lactiques**

Parmi la collection des coques, quatre isolats (S2, S4, S6, S9) ont montré une capacité à produire le CO₂ à partir du glucose (hétérofermentaires) et possède une variabilité de croissance en milieu hypersalé à 6,5% NaCl. Ces isolats ont été rattachés au genre *Leuconostoc*, caractérisé mésophiles et thermophiles (LAHTINEN *et al.*, 2011 ; FENNEMA *et al.*, 2004). La souche codée S2 se rapproche de l'espèce *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* par son particularité à produire le dextrane, elle n'hydrolyse pas l'arginine et fermente le maltose, le sucrose, le lactose et le saccharose et fermente différemment le mannitol et le mannose (DE ROISSART et LUQUET, 1994 ; HAMMES et HERTEL, 2009). Cette espèce a été isolée du lait de chèvre et du fromage Roquefort (ZAROOUR *et al.*, 2013), du fromage grec traditionnel Feta fabriqué au lait de brebis, avant et après un mois d'affinage (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011) et du fromage traditionnel Tibetan Qula (ZHANG *et al.*, 2015). *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* possède un niveau élevé de production de CO₂ et utilisée dans certains fromages bleus (Roquefort, Stilton) pour favoriser l'ouverture de la texture (STANLEY, 1998).

La souche S4 est incapable à se développer à 45°C mais elle pousse bien à 6,5% NaCl. Elle dégrade le saccharose et le maltose et fermente différemment le mannitol et le lactose, elle semble être l'espèce *Ln. paramesenteroides* (DE ROISSART et LUQUET, 1994). Cette espèce fait partie de l'écosystème microbien du fromage Anevato ; fromage grec traditionnel à pâte molle (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011).

La souche S6 est hétérofermentaire, capable à se développer à 10°C et 45°C, elle pousse à pH 9,6 et dans le NaCl à 4%, mais pas à 6,5% ni dans le bleu de Sherman à 0,1 % et 0,3%. Elle est ADH⁻ et produit faiblement l'acétoïne. Elle ne produit pas le dextrane et dégrade le lactose, le maltose le mannose et le sucrose et fermente différemment le mannitol. Ces propriétés se ressemblent à celles de *Ln. argentinum* (DICKS *et al.*, 1993). La souche St₃ a montré une capacité à croître à 10°C et 45°C et pourvu d'un caractère hétérofermentaire. Elle est ADH⁻, elle fermente le mannose, le mannitol, le sucrose, le lactose et le maltose. Cette souche a été identifiée en tant que *Ln. kimchii* (HAMMES et HERTEL, 2009). Elle peut se développer dans un bouillon hypersalé à 4% et 6,5% NaCl mais pas dans le lait de Sherman (0,1% et 0,3%) et à pH 9,6. Elle produit fortement l'acétoïne.

Les deux isolats codées S8 et S10, identifiées comme étant *Pediococcus pentosaceus* ssp. *intermedius* sont homofermentaires, capables à se croître à 40°C et 45°C et à 10% NaCl. Elles sont ADH⁺ et acétoïne⁻, capables à fermenter le glucose, le mannose, le maltose et le lactose, elles fermentent différemment le sucrose mais pas le mannitol (ZHANG et CAI, 2014).

L'espèce S11 a montré une capacité à croître à 10°C mais pas à 45°C, pourvu d'un caractère homofermentaire et incapable à se développer à 6,5% NaCl et à pH 9,6. Cette souche présente une sensibilité vis-à-vis du tellurite de potassium. D'après ces caractéristiques nous l'avons classé au genre *Lactococcus*. En se basant sur le test d'ADH (-), d'actéoïne (-), la sensibilité au bleu de méthylène et le profil fermentaire des sucres qui a été positif avec le lactose et le maltose, cette espèce est identifiée en tant que *Lactococcus piscium*.

Les trois souches codées S1, S3 et S7 caractérisées homofermentaires et capables à se développer à 10°C, à 45°C et à pH 9,6, résistantes aux différentes concentrations en NaCl (4% et 6,5%) sont classées au genre *Enterococcus*. La souche S1 est ADH⁻ et acétoïne⁻. Elle fermente le sucrose, le lactose et le mannitol, identifiée comme étant *E. avium* (COLLINS *et al.*, 1984). Cette espèce a été également isolée du fromage Feta (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011), du fromage Tulum à la fin d'affinage (CAKMAKCI *et al.*, 2008) et des fromages espagnols ; Roncal et Idiazábal (fromages à base de lait de brebis) (ARIZCUN *et al.*, 1997).

La souche S3 se rapproche de l'espèce *E. mundtii* caractérisée par sa capacité de développement à 45°C et 6,5% NaCl. Elle dégrade le sucrose, le lactose et le mannitol (COLLINS *et al.*, 1986). Elle est ADH⁻ et acétoïne⁺. Selon CAKMAKCI *et al.* (2008), *E. mundtii* a été isolée du fromage Tulum fabriqué dans les sacs en plastique à neuf mois d'affinage. Elle est présente également dans le fromage Tibetan Qula (ZHANG *et al.*, 2015).

La souche S7 est ADH⁺ et acétoïne⁺ elle fermente le sucrose et le lactose mais pas le saccharose et le mannitol. Elle se développe à 45°C et 6,5% NaCl, cette espèce se ressemble à *E. hirae* (FARROW et COLLINS, 1985). Elle est présente dans le fromage Feta Manoura fabriqué à base du lait de vache ou d'un mélange de lait de vache et lait de chamelle (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011) et dans le fromage Tibetan Qula (ZHANG *et al.*, 2015).

L'isolat codée S5, a présenté un aspect différent sur le bouillon M17 par la formation de fragments dans un milieu qui reste clair. Alors que sur le milieu M17 solide, les colonies sont intactes. La forme des cellules au microscope est irrégulière. Cette souche possède une capacité de développement aux différentes températures (10°C et 45°C) et concentrations en NaCl (4% et 6,5%) ainsi à pH 9,6. Elle est ADH⁻ et acétoïne⁺. Elle possède une faible capacité à produire le CO₂, et fermente tous les sucres testés sauf le mannitol et le maltose. Cette espèce se rapproche du genre *Bifidobacterium*.

➤ Lactobacilles

La forme bâtonnet observé au microscope, le type de la coloration de Gram (+) et la catalase négative, nous ont orientés pour classer 08 isolats dans le genre *Lactobacillus*. La division classique des lactobacilles a été basée sur leurs caractéristiques fermentaires: (1) homofermentaire obligatoire; (2) hétérofermentaire facultatif; et (3) hétérofermentaire obligatoire (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

Les tests biochimiques et physiologiques et les profils fermentaires des sucres enregistrés (Tableau 11) sont comparés avec celui des souches de référence et nous a amené à définir les différentes espèces.

Les souches L4 et L6 sont hétérofermentaires et mésophiles, elles fermentent tous les sucres testés. Selon DE ROISSART et LUQUET (1994), *Lb. plantarum* est capable à fermenter le saccharose, le mannitol, le maltose et le lactose. Cette espèce est incapable à se développer à 45°C (STILES et HOLZAPFEL, 1997). Cela permet de les identifier comme étant *Lb. plantarum*, espèce prédominant des lactobacilles isolés des fromages Grec traditionnels Batzos, Feta, Teleme, Kopanisti, Krassotyri, Graviera, Kefalotyri et Manoura, (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011) et du fromage TMM (CARAFA *et al.*, 2015). Elle constitue une espèce majeure des NSLAB dans le fromage Cheddar (MC CARTHY *et al.*, 2015).

Lb. plantarum a été identifiée dans l'écosystème du fromage *Bouhezza* comme espèce dominant (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011b; SAOUDI, 2012), dans le biofilm de la *Chekoua* et le *Lben* de fabrication (SENOUSSI, 2013).

Les isolats codées L3 et L7 sont aptes à se développer à 10°C, à 15°C et à 45°C, elles sont homofermentaires. Elles dégradent le mannitol, le maltose et différemment le lactose et

le saccharose, propriétés trouvés chez *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*. Cette espèce a été caractérisée dans le fromage Feta (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011).

Les souches L1 et L5 poussent à 15°C et à 45°C. Elles possèdent une capacité à fermenter le mannitol, le lactose, le maltose et le sucrose. Ces caractéristiques sont rencontrées chez *Lb. rhamnosus*. Elles produisent le CO₂ à partir du glucose. Selon STILES et HOLZAPFEL (1997), *Lb. rhamnosus* est classée dans le groupe des lactobacilles hétérofermentaire facultatifs. Cette espèce fait partie de l'écosystème microbien du fromage Feta (LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS, 2011), du fromage PDO Grana Padano (fromage traditionnel de 13 mois d'affinage) (POGACIĆ *et al.*, 2013), du fromage Coalho (fromage au lait de chèvre) (ROLIM *et al.*, 2015) et du fromage TMM (CARAFA *et al.*, 2015).

L'isolat codé L2 est capable à se développer à 10 et 15°C mais pas à 45°C donc il est mésophile. Il pousse à pH 9,6 et à 4% et 6,5% NaCl. Il produit le CO₂ à partir du glucose. Cette souche est acétoïne⁺ et ADH⁻ et elle a fermenté la totalité des sucres testés. Elle n'a pas été classée sous une espèce précise (*Lactobacillus* ssp). La souche L8 est thermophile et possède les mêmes propriétés de L2.

Les bactéries lactiques rencontrées dans les échantillons du fromage *Bouhezza* au cours de la caractérisation microbiologique sont rassemblé dans le tableau 12. Elles sont représentés par six genres soit *Lactobacillus* (42,10%), *Leuconostoc* (21,05%), *Enterococcus* (15,78%), *Pediococcus* (10,52%), *Lactococcus* (05,26%), et les *Bifidobacterium* (05,26%) (Figure 16). Les Lactobacilles prédominent dans le fromage *Bouhezza*.

D'après CAKMAKCI *et al.* (2008), Les lactobacilles et les lactocoques prédominent dans les fromages non affinés et les lactocoques disparaissent rapidement après trois mois d'affinage. Les lactobacilles sont le principal groupe des bactéries lactiques présent dans plusieurs types de fromages.

Le fromage traditionnel Italien TMM (Traditional Mountain Malga cheese) fabriqué au lait de vache a été caractérisé par la prédominance des espèces *Lb. paracasei* et *P. pentosaceus* (CARAFA *et al.*, 2015). Selon CAKMAKCI (2008), les espèces de *Lactobacillus* et *Enterococcus* étaient les prédominants dans le fromage Tulum fabriqué en peau.

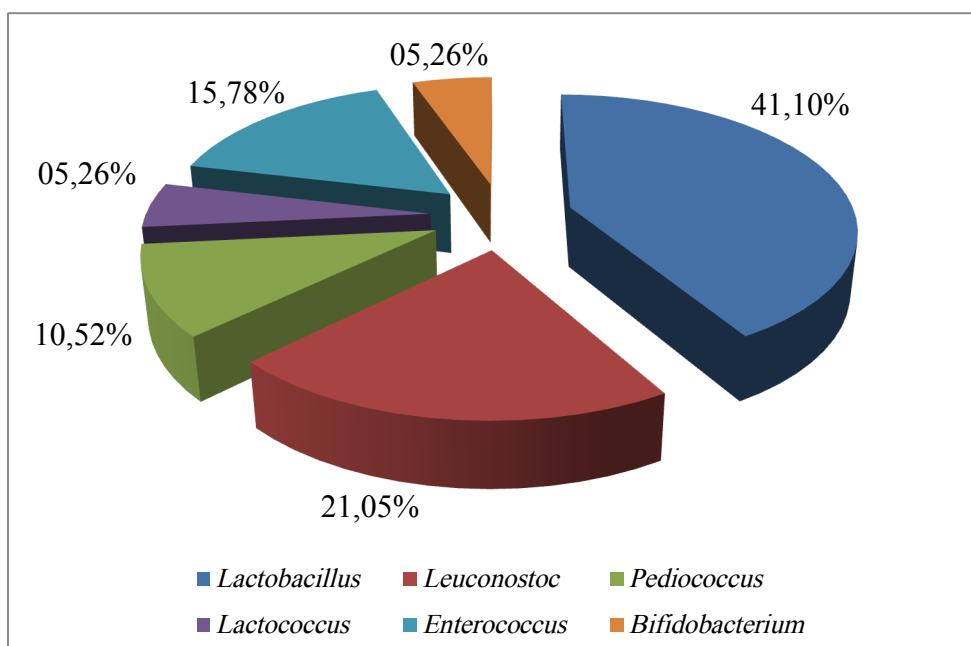


Figure 16. Répartition des espèces de la collection lactique (%)

Tableau 12. Résultats de l'identification des espèces après comparaison avec des tableaux référentiels de DE ROISSART et LUQUET, (1994) ; STILES et HOLZAPFEL (1997) et ZHANG et CAI (2014)

Genre	Code de la souche	espèce
<i>Lactobacillus</i>	L1	<i>Lb. rhamnosus</i>
	L2	<i>Lactobacillus</i> ssp.
	L3	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
	L4	<i>Lb. plantarum</i>
	L5	<i>Lb. rhamnosus</i>
	L6	<i>Lb. plantarum</i>
	L7	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
	L8	<i>Lactobacillus</i> ssp.
<i>Leuconostocs</i>	S2	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
	S4	<i>Ln. paramesenteroides</i>
	S6	<i>Ln. argentinum</i>
	S9	<i>Ln. kimchii</i>
<i>Pediococcus</i>	S8	<i>Pc. pentosacius</i> ssp. <i>intermedius</i>
	S10	<i>Pc. pentosacius</i> ssp. <i>intermedius</i>
<i>Lactococcus</i>	S11	<i>Lc. piscium</i>

<i>Enterococcus</i>	S1	<i>E. avium</i>
	S3	<i>E. mundtii</i>
	S7	<i>E. hirae</i>
<i>Bifidobacterium</i>	S5	<i>Bifidobacterium</i> ssp.

IV- Aptitudes technologiques des isolats de bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont traditionnellement utilisées comme levains "naturelles" ou "sélectionnées" dans la fabrication des fromages et la fermentation des produits laitiers à cause de leurs fonctions de préservation et leur contribution aux propriétés organoleptiques (GULAHMADOV *et al.*, 2006).

IV-1- Pouvoir acidifiant

La plupart des producteurs fermiers insulaires utilisent la flore lactique naturelle pour provoquer l'acidification nécessaire à l'égouttage du caillé et à sa protection contre le développement de germes de contamination. Cette pratique présente l'avantage de faire travailler une flore variée qui peut être représentative de la fromagerie, ce qui contribue à fournir au fromage un goût caractéristique (CASALTA *et al.*, 1995).

La fonction acidifiante constitue donc la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries agro-alimentaires car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à intérêt. Le suivi de l'activité acidifiante des souches étudiées a été réalisé sur le milieu lait écrémé stérilisé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13.

La coagulation du lait par les bactéries lactiques peut être provoqué soit par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique qui provoque l'abaissement du pH et la coagulation du lait; soit par un système enzymatique ou enzymes protéolytiques qui ont la propriété de coaguler le lait.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce.

Toutes les espèces du genre *Lactobacillus* présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Après deux heures d'incubation à 37°C, les valeurs de pH ont diminuées de 6,77 à 6,63, en parallèle la

quantité d'acide lactique produite se situe entre 1,5 g et 2,1 g d'acide lactique par litre de lait. Au bout de 24 h, les valeurs de pH se trouvent situées entre 4,65 et 5,46, de même la quantité d'acide lactique se situe entre 4,0 g/L et 6,7 g/L pour les lactobacilles. Ce caractère se diffère d'une espèce à une autre dans le même genre *Lactobacillus*.

Pour la souche *Lb. plantarum* (L4 et L6), l'acidité a évolué de 19°D à 56°D pour le premier isolat (L4) et de 19°D à 67°D pour le deuxième. Les espèces de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L3 et L7) ont présenté une production importante d'acide lactique qui atteint 6,3 g/L et 6,7 g/L après 24 heures d'incubation à 37°C. Les deux espèces identifiées en tant que *Lb. rhamnosus* (L1 et L5) ont produit 40 g/L et 50 g/L avec des valeurs de pH de 5,46 et 5,18. Les deux espèces *Lactobacillus* ssp. (L2 et L8) ont présenté un pouvoir acidifiant aussi important de 56°D et 58°D, le pH atteint est de 4,94 et 4,92.

Les espèces de *Pc. Pentosaceus* ssp. *intermedius* (S8 et S10) étaient les plus acidifiantes par rapport aux autres coques étudiées. La quantité d'acide lactique produite est en moyenne de 6,4 g/L et 6,5 g/L après 24 h. En parallèle, les valeurs de pH atteintes avec ces souches oscillent entre 4,94 et 4,82. La cinétique d'acidification a montré que les souches *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (S2), *Ln. argentinum* (S6) et *Ln. kimchii* (S9) étaient moins acidifiantes en produisant des quantités variables d'acide lactique dont les moyennes sont de 4,4 g/L, 3,2 g/L et 3,0 g/L respectivement.

La souche S4 appartenant au genre *Bifidobacterium* possède une activité acidifiante moyenne avec une quantité d'acide lactique de 4,0 g/L après 24 h. Le pH du milieu a diminué de 6,77 à 5,71. L'espèce *E. mundtii* (S3) a présenté l'activité acidifiante la plus faible avec une production uniquement de 2,5 g/L d'acides lactiques après 24 h.

Tableau 13. Evolution du pH et de l'acidité (en °D) des isolats testés au cours du temps

Acidité (°D) Espèces	T0h		T2h		T6h		T24h	
	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité	pH
<i>Lb. rhamnosus</i> L1	19	6,77	19	6,65	21	6,46	40	5,46
<i>Lactobacillus</i> ssp. L2	19	6,77	19	6,73	20	6,65	56	4,94
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> L3	19	6,77	20	6,60	25	6,24	63	4,81
<i>Lb. plantarum</i> L4	19	6,77	20	6,57	26	6,07	67	4,67
<i>Lb. rhamnosus</i> L5	19	6,77	19	6,66	20	6,52	50	5,18

<i>Lb. plantarum</i> L6	19	6,77	20	6,68	23	6,40	67	4,68
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> L7	19	6,77	21	6,65	23	6,31	67	4,65
<i>Lactobacillus</i> ssp. L8	19	6,77	20	6,63	24	6,38	58	4,92
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> S2	19	6,77	21	6,75	21	6,67	44	5,76
<i>Ln. argentinum</i> S6	19	6,77	21	6,75	21	6,69	32	6,01
<i>Ln. kimchii</i> S9	19	6,77	21	6,67	31	6,63	30	6,08
<i>Pc. Pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i> S8	19	6,77	21	6,70	31	6,02	64	4,94
<i>Pc. Pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i> S10	19	6,77	21	6,61	33	5,90	65	4,82
<i>E. mundtii</i> S3	19	6,77	21	6,71	20	6,66	25	6,42
<i>Bifidobacterium</i> S5	19	6,77	21	6,72	21,5	6,62	40	5,71

Nos résultats se concordent et ceux de MAMI (2013), qui a montré que la souche de *Lb. plantarum* produit une valeur élevée d'acide lactique de 68°D (6.8 g/L) après 24 h d'incubation à 30°C et de 130°D (13 g/L) après 48 h. Une étude de MAGHNIA (2011), a montré un pouvoir acidifiant important des souches de lactobacilles avec une concentration d'acide lactique de 59°D et un pH de 3,99 après une incubation à 37°C pendant 24 h.

D'après MOON *et al.* (2012), l'espèce *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* CHB2121 est une espèce prometteuse pour une production industrielle de concentrations élevées d'acide lactique (L). Cette espèce produit 192 g/L d'acide lactique dans un milieu contenant 200 g/L de glucose.

Les travaux réalisés par MAGHNIA (2011), ont montré une activité acidifiante des espèces du genre *Leuconostoc*, supérieure à celle obtenue dans notre étude avec des quantités d'acide lactique de 4,8 et 5,1 g/L. D'après BADIS *et al.* (2005), une lente activité acidifiante a été trouvée chez les *Leuconostoc*.

La faible acidification provoquée par les entérocoques est comparable à celle d'AMBADOYIANNIS *et al.* (2005) et de SARANTINOPOULOS *et al.* (2001) que les entérocoques isolés du fromage Feta sont faiblement acidifiants. *Pc. pentosaceus* peut accroître et produire l'acide lactique même dans un environnement de limites relativement larges (BLICKSTAD et MOLIN, 1981). D'ailleurs, *Pc. pentosaceus* joue un certain rôle dans la fermentation et donc la maturation du fromage (CALLON *et al.*, 2004).

L'acidification par les LAB possède un effet important sur la texture du fromage. Selon STANLEY (1998), les fromages à pH élevé (entre 5,2 et 5,5) (exemple des variétés hollandaises) possèdent une texture flexible ou plastique dans lesquels les agrégats protéiques ont une forme globulaire similaire (10-15 nm de diamètre), semblables à ceux du lait. Dans les fromages à pH bas (pH 4,8) tel que les fromages anglais de terroir ; Cheshire et Lancashire, les agrégats protéiques sont plus petits (3-4 nm) et la texture est incohérente ou friable.

IV-2- Pouvoir protéolytique

Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques sont importants, en tant que des moyens qui rendent la protéine et le peptide N disponibles pour la croissance et essentiellement, en tant qu'élément de traitement dans les procédés de maturation qui donnent aux aliments leurs propriétés rhéologiques et caractéristiques organoleptiques (LAW et KOLSTAD, 1983).

Les résultats de la protéolyse réalisée sur les milieux MRS et M17 additionnés du lait écrémé pour les différents isolats sont résumés dans le tableau 14. Il en ressort du tableau que la plupart des souches étudiées présentent une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques (figure 17).

Ces résultats montrent que les espèces du genre *Lactobacillus* sont fortement protéolytiques comparativement aux autres espèces avec des valeurs entre 16,5 et 18,5 mm de diamètre. L'activité protéolytique d'*E. avium* et *E. mundtii* est faible (12 mm de diamètre), par contre l'espèce *E. hirae* a présenté un niveau élevé de protéolyse ($19,50 \pm 0,70$ mm). Les espèces du genre *Leuconostoc* ont présenté un pouvoir protéolytique autour de 13 mm sauf l'espèce *Ln. paramesenteroide* qui n'a présenté aucune activité protéolytique. *Pc. Pentosaceus* ssp. *intermedius* possède une activité moyenne ($15,50 \pm 2,12$ mm). *Lc. piscium* a montré une zone de lyse de 12 mm de diamètre.

Tableau 14. Diamètres de protéolyse par les isolats de bactéries lactiques (en mm)

Genres	Espèces	Diamètre (mm)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i> L1	$18,00 \pm 0,00$
	<i>Lactobacillus</i> ssp. L2	$17 \pm 0,00$
	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> L3	$16,50 \pm 0,70$
	<i>Lb. plantarum</i> L4	$17,50 \pm 0,00$

	<i>Lb. rhamnosus</i> L5	18,00 ± 0,00
	<i>Lb. plantarum</i> L6	18,50 ± 2,12
	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> L7	18,50 ± 2,12
<i>Leuconostocs</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> S2	13,50 ± 2,12
	<i>Ln. paramesenteroide</i> S4	00,00 ± 0,00
	<i>Ln. argentinum</i> S6	13,00 ± 0,00
	<i>Ln. kimchii</i> S9	14,00 ± 2,82
<i>Enterococcus</i>	<i>E. avium</i> S1	12,00 ± 0,00
	<i>E. mundtii</i> S3	12,00 ± 0,00
	<i>E. hirae</i> S7	19,50 ± 0,70
<i>Pediococcus</i>	<i>Pc. Pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i> S8	15,50 ± 2,12
	<i>Pc. Pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i> S10	13,50 ± 0,70
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. Piscium</i> S11	12,00 ± 1,41
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium</i> ssp. S5	12,50 ± 0,70

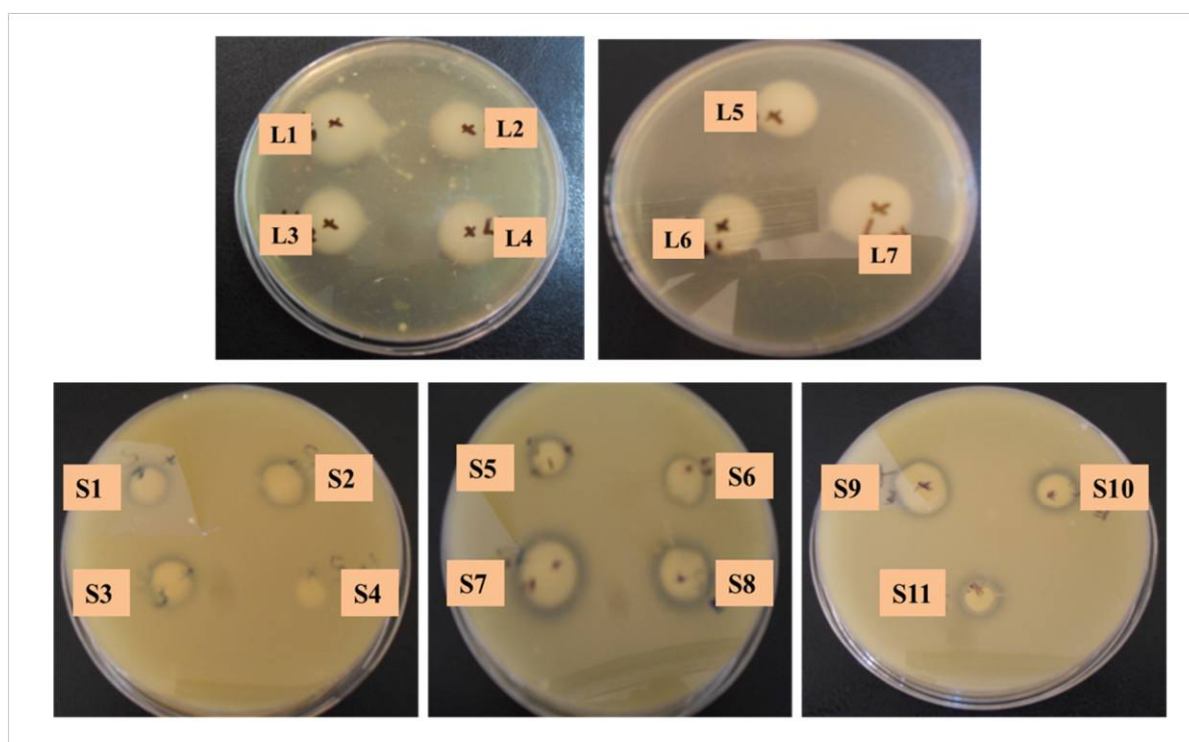


Figure 17. Diamètres des zones de protéolyse par les isolats de bactéries lactiques sur milieux MRS et M17 additionnés du lait écrémé (en mm)

Selon (CASTBERG et MORRIS, 1976), les lactobacilles produisent généralement des protéinases neutres actives sur le α -, β - et κ - caséine mais l'intensité de leur activité est

extrêmement variable d'une espèce à une autre. Les travaux de LITOPOULO-TZANETAKI et TZANETAKIS (2011), ont montré que les activités d'aminopeptidase sont largement dues aux lactobacilles.

Lb. plantarum isolée du fromage Feta a présenté des activités lipolytiques et peptidolytiques (XANTHOPOULOS *et al.*, 2000a,b). Les quantités d'acides aminés accumulés dans le lait sont basses et dépendantes des espèces. Un groupe d'enzymes peptidolytiques peut être détectée dans des isolats de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* isolée du fromage Feta et que cette espèce peut dégrader les caséines (BINTSIS *et al.*, 2003).

Certaines espèces du genre *Enterococcus* présentent une faible activité protéolytique (AMBADOYIANNIS *et al.*, 2005; SARANTINOPOULOS *et al.*, 2001). ARIZCUN *et al.* (1997), ont montré que les niveaux de l'activité d'aminopeptidase et protéinase des entérocoques est faible.

Les espèces du genre *Leuconostoc* se développent mal dans le lait puisque, ils ne dépassent pas $5 \cdot 10^8$ UFC/mL (COGAN et JORDAN, 1994; DEMIRCI et HEMME, 1994; BELLENGIER *et al.*, 1997b). Leur développement peut atteindre 10^9 UFC/mL quand la teneur du lait en nitrogène non protéique (NPN : non-protein nitrogen) est artificiellement augmentée par l'addition des acides aminés ou des peptides (par exemple mélange d'acides aminés, extrait de levure, etc..). Ceci indique qu'elles manquent d'activités protéolytiques convenables qui pourraient leur fournir le NPN assimilable (VEDAMUTHU, 1994; BELLENGIER *et al.*, 1997a, b; SERVER-BUSSON *et al.*, 1999).

Les espèces de *Pc. pentosaceus* isolées du fromage, sont capables à hydrolyser la β -caséine et possèdent des activités élevées des protéinase, aminopeptidase, et dipeptidyl aminopeptidase (VAFOPOULOU- MASTROJIANNAKI *et al.*, 1994).

IV-3- Pouvoir aromatisant

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés. Le développement d'arôme dans les fromages résulte des activités métaboliques des bactéries lactiques (glycolyse, lipolyse et protéolyse) (MARILLEY et CASEY, 2004).

Les résultats présentés par la figure 18, montrent que toutes les souches appartenant au genre *Lactobacillus* arrivent à produire des arômes (acétoïne) dont l'anneau rouge le

témoigne, donc ils ont un pouvoir aromatisant qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques du fromage.

Pour les lactocoques isolées, la production des arômes est moins importante que celle des lactobacilles. La souche S9 identifiée en tant que *Ln. kimchii* présente une production importante d'acétoïne d'où une coloration intense du milieu Clark et Lubs. Les souches ; *E. avium* (S1), *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* (S2), *Ln. paramesenteroide* (S4) et *Lc. piscium* (S11) sont incapables à produire l'acétoïne d'où l'absence de la couleur rose dans le milieu. Le reste des espèces ; *E. mundtii* (S3), *Bifidobacterium* (S5), *Ln. argentinum* (S6), *E. hirae* (S7), *Pc. Pentosaceus ssp. intermedius* (S8 et S10) sont doués d'un pouvoir aromatisant avec une intensité qui se diffère d'une espèce à une autre (figure 19).

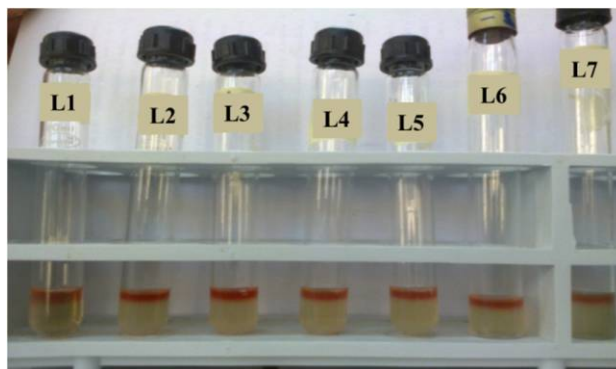


Figure 18. Production de l'acétoïne par des souches de lactobacilles

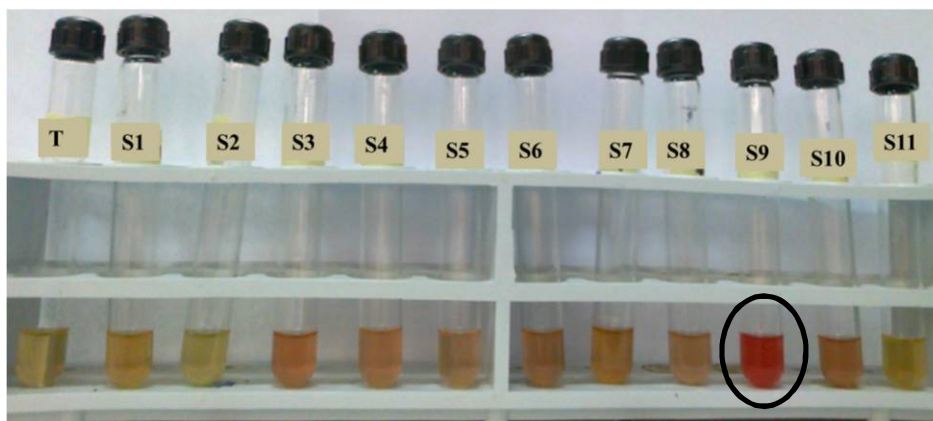


Figure 19. Production de l'acétoïne par des coques lactiques

Selon HAMMES et HERTEL (2006), les lactobacilles peuvent participer à la fermentation malolactique, qui contribue à la saveur du cidre, ils peuvent également métaboliser le citrate et le pyruvate, produisant l'acétate, le lactate et l'acétoïne. Une étude de MONTVILLE et *al.* (1987), a montré la production d'acétoïne à partir du pyruvate par *Lb. plantarum*.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont capables à métaboliser le citrate et le malate en acétoïne et diacétyl qui enrichissent les saveurs du fromage, du beurre et d'autres produits laitiers (PAPAGIANNI et ANASTASIADOU, 2009). Ces propriétés permettent leur utilisation dans les fermentations lactières (BALAKRISHNAN et AGRAWAL, 2014).

Le genre *Leuconostoc* joue des rôles importants dans la technologie des produits laitiers, en particulier par la production de gaz et des composés aromatiques (HEMME et FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004). Selon VEDAMUTHU (1994), le composé major lié à l'utilisation de ce genre dans le domaine laitier est le diacetyl, l'acétate et l'éthanol contribuant à la formation de l'arôme.

Selon LITOPOULOU-TZANETAKI et TZANETAKIS (2011), les principaux composants volatils produits par les entérocoques sont l'acétaldéhyde, l'éthanol et l'acétoïne.

IV-4- Pouvoir antibactérien

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques sont dérivées de la concurrence pour les nutriments et la production d'un ou plusieurs métabolites antimicrobiennes actifs tels que les acides organiques (principalement l'acide lactique et l'acide acétique), le peroxyde d'hydrogène et d'autres composants tels les bactériocines et les peptides antifongiques (REIS *et al.*, 2012). Les bactériocines sont produites par la plupart des genres des bactéries lactiques y compris *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostocs*, *Streptococcus* et *Enterococcus* (GROSU-TUDOR *et al.*, 2014).

Dans ce travail, la révélation du spectre d'activité antibactérienne des isolats de bactéries lactiques a été réalisée sur des bactéries pathogènes gram positif (*L. monocytogenes* ATCC, *S. aureus* CIP 4.83, *B. subtilis* ATCC6633 et *B. cereus*) et gram négatif (*E. coli* (DH5)). La pureté de ces dernières a été confirmée par la coloration de gram (figure 20).

La méthode de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971) a été utilisée pour la détection des inhibitions. L'activité inhibitrice se traduit par la formation d'un halo autour des puits, La lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition. Les résultats de l'activité antibactérienne sont représentés dans le tableau 15.

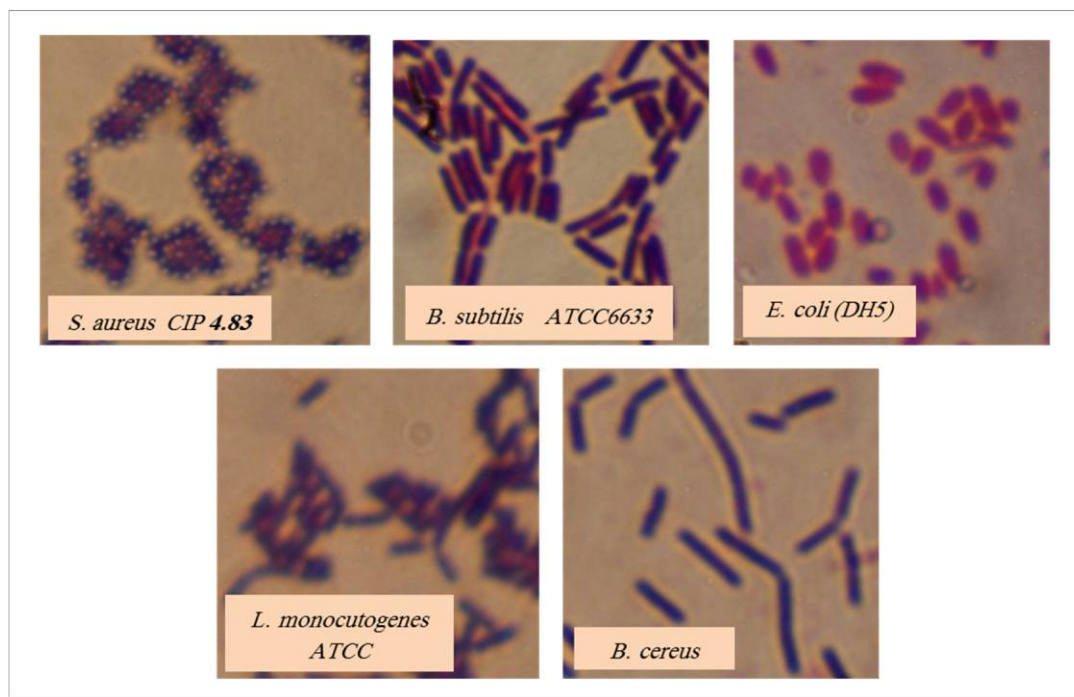


Figure 20. Vérification de la pureté des bactéries pathogènes par la coloration de Gram

D'après ces résultats, les surnageants natifs des espèces *Lb. plantarum* L4 et L6, *Lb. rhamnosus* L1 et L5, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* L3 et *Lactobacillus* ssp. L2 ont présenté une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée sur toutes les bactéries pathogènes (*E. coli* (DH5), *L. monocytogenes* ATCC et *B. cereus*) avec des diamètres d'inhibition de 15 à 27 mm, sauf sur *S. aureus* CIP 4.83 et *B. subtilis* ATCC6633 où aucune inhibition n'a été obtenue. Le deuxième isolat de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* L7 a montré un effet antibactérien vis-à-vis de *B. cereus* avec une zone d'inhibition de 27 mm de diamètre. L'effet inhibiteur de la souche *Lactobacillus* ssp. L8 est noté contre *L. monocytogenes* ATCC, *B. cereus* et *B. subtilis* ATCC6633 avec des zones d'inhibition de 15, 11 et 12 mm respectivement (tableau 15).

L'abaissement du pH dans le milieu MRS liquide à des valeurs entre 4,39 et 5,44 signifie que les lactobacilles possèdent un effet acidifiant, en produisant des acides organiques, les principaux facteurs d'inhibition. Cette diminution est due à la production de l'acide lactique à partir du glucose présent dans le milieu MRS qui modifie le pH du milieu (HEILLIG *et al.*, 2005).

La souche *Ln. mesenteroide* ssp. *mesenteroide* S2 présente une faible inhibition de *E. coli*, *L. monocytogenes* ATCC et *B. cereus* avec des zones d'inhibition de 11, 11 et 7 mm respectivement. L'effet inhibiteur de *Ln. paramesenteroide* S1' est observé contre *E. coli* (10 mm).

Les entérocoques ; *E. avium* **S1**, *E. mundtii* **S3** et *E. hirae* **S7** présentent une inhibition de *L. monocytogenes* ATCC avec des diamètres d'inhibition de 12 à 15 mm. Elles n'ont montré aucune inhibition vis-à-vis des restes pathogènes. L'inhibition par les espèces des genres *Enterococcus* et *Leuconostoc* est probablement due à la production d'une substance inhibitrice, sachant que le pH des surnageants natifs est proche de la neutralité (6,67 et 6,76) ce qui permet d'écarter l'effet d'acidité dû à la production d'acide lactique.

Le premier isolat de l'espèce *Pc. pentosaceus* ssp. *intermedius* **S8** possède un effet antibactérien vis-à-vis de *L. monocytogenes* ATCC avec un diamètre d'inhibition de 15 mm par contre le deuxième isolat (S10) a inhibé en plus de *L. monocytogenes* ATCC (20 mm), *E. coli* (DH5) et *B. cereus* avec 12 mm.

La nisine a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les pathogènes à gram positif. Aucune inhibition n'a été observée avec *E. coli* (gram négatif). La nisine est ajoutée fréquemment aux fromages du lait pasteurisé pour prévenir la germination des spores de *Clostridium*, tel que *Clostridium tyrobutyricum* (SCHILLINGER *et al.*, 1996).

La nisine dans une solution à pH 5,0 et 6,8 perd respectivement 40 et plus de 90 % de son activité après un autoclavage à 115,6°C, alors qu'à pH 2 aucune diminution de l'activité n'est observée (HURST, 1981).

Tableau 15. Diamètres des zones d'inhibition des surnageants natifs des bactéries lactiques testées vis-à-vis des souches pathogènes (en mm)

Souches	pH	<i>E. coli</i> (DH5)	<i>S. aureus</i> CIP 4.83	<i>L. monocytogenes</i> ATCC	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC6633
L1	4,94	17	00	27	27	00
L2	5,44	15	00	25	26	00
L3	4,89	19	00	25	21	00
L4	4,67	16	00	30	25	00
L5	4,98	15	00	30	15	00
L6	4,54	18	20	30	27	00
L7	4,68	00	00	00	27	00
L8	4,39	00	00	15	11	12
S1	6,67	00	00	13	00	00
S2	6,66	11	00	11	07	00

S3	6,76	00	00	15	00	00
S4	6,92	10	00	00	00	00
S5	5,98	00	00	00	00	00
S6	6,44	00	00	00	11	00
S7	5,95	00	00	12	00	00
S8	5,94	00	00	15	00	00
S9	6,80	11	00	13	00	00
S10	5,92	12	00	20	12	00
S11	6,68	12	00	00	00	00
nisine	2,77	00	15	20	18	20

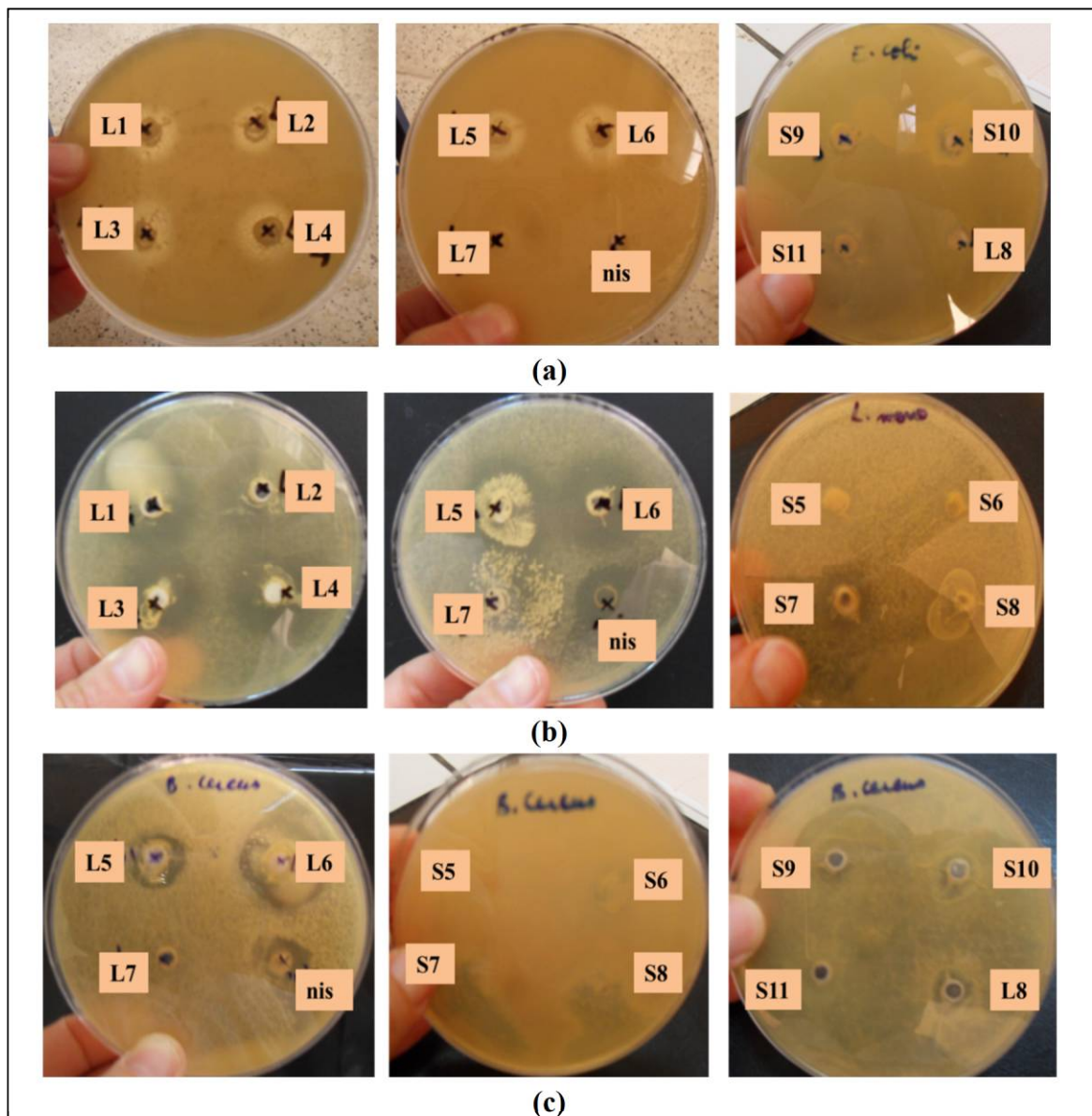


Figure 21. Diamètres des zones d'inhibition des isolats lactiques vis-à-vis de (a) *E. coli* (DH5), (b) *L. monocytogenes* ATCC et (c) *B. cereus*

D'après ADAMS et MOSS (2008), la production d'acide lactique et de l'acide acétique et la diminution consécutive du pH sont de loin les plus importants facteurs d'inhibition. Dans une étude menée par JINET *et al.* (1996), il est suggéré que l'inhibition de *Lactobacillus* à l'égard des souches pathogènes de *Salmonella* et *E. coli* est due à la production d'acides organiques par *Lactobacillus*. GUDKOW (1987) et TAYLOR (2005) ont montrés qu'*E. coli* est inhibé par l'acide lactique à pH de 5,1. Une étude d'ANTONIO *et al.* (1999) a montré que la production d'acide lactique, d' H_2O_2 , de bactériocines et d'autres substances antimicrobiennes par les lactobacilles contribuent, avec le maintien d'un pH acide inférieur à 4,5, à produire un effet barrière réduisant fortement les risques d'infection.

Le travail de COELHO *et al.* (2014), a montré que les espèces d'*Enterococcus* peuvent avoir une grande importance technologique dans les fromages par le contrôle de *L. monocytogenes* et que la combinaison de deux bactériocines produits par *Enterococcus* ssp. optimisent la réduction de *L. monocytogenes* par 5 log unités après 7 jours dans un fromage frais. Selon DOS SANTOS *et al.* (2014), les espèces du genre *Enterococcus* ont été reportées pour produire des bactériocines de la classe I, IIa, IIb, IIc et III. Une étude de CAVICCHIOLI *et al.* (2015), a montré que *L. monocytogenes* est spécialement inhibé par les isolats d'*Enterococcus* isolés à partir du lait de chèvre.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont connues par leur effet inhibiteur sur plusieurs organismes de détérioration et pathogènes (GILLILAND et SPECK 1975; RACCACH *et al.*, 1979). L'espèce *Pediococcus pentosaceus* joue un rôle important dans la préservation des aliments par la production de pediocines actives contre les bactéries pathogènes tel que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum* (RACCACH, 1987).

Les bactériocines produites par des espèces du genre *Leuconostoc* appartiennent aux bactériocines de sous-classe IIa comme le pediocin, sont des petits peptides non-modifiés, thermostables, et actifs contre *Listeria* (ENNAHAR *et al.*, 2000).

Des données plus fines sur le lien entre pratiques et flores des laits permettraient de préconiser les pratiques à mettre en œuvre pour préserver la «bonne» diversité microbienne et pour agir avec plus de discernement sur l'élimination des "flores indésirables". A l'heure actuelle, la majorité des guides de bonne pratique concerne uniquement la réduction de la contamination en bactéries pathogènes (MONTEL *et al.*, 2003).

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion et perspectives

La présente étude a été conduite dans le but de connaître les propriétés technologiques de la population lactiques présente dans le fromage traditionnel affiné *Bouhezza*. Quatre échantillons de fromage collectés de différentes fermes de la zone de terroir ont fait l'objet d'étude.

Les résultats des analyses physico-chimiques sur le fromage de *Bouhezza* ont montré un taux d'extrait sec total (EST en g /100 g de fromage) entre $20,4 \pm 0,28$ et $30,95 \pm 0,60\%$. Les valeurs de pH sont comprises entre 3,79 et 4,32 avec une teneur en acide lactique entre 3,51 et 5,79 gramme pour cent gramme de fromage.

Sur le plan de la caractérisation microbiologique de *Bouhezza*, les échantillons analysés ont montré une diversité microbienne constituée principalement de la flore lactique. La charge des lactobacilles et des streptocoques lactiques varie de 10^5 à 10^7 UFC/g et 10^5 à 10^8 UFC/g respectivement. La flore secondaire est présentée par les levures et moisissure (10^4 à 10^5 UFC/g). Dans l'ensemble des échantillons de *Bouhezza*, l'absence de la flore pathogène a été confirmée par la recherche de *Clostridium sulfitoréducteur* et des streptocoques fécaux. Les risques de contamination sont notés par la présence des coliformes totaux dans un seul échantillon (à 15 jours d'affinage) avec une faible charge des coliformes fécaux (10^2 UFC/g).

A l'issue de ces dénombrements, trente-six (36) souches ont été isolées et purifiées. L'identification a été réalisée uniquement sur dix-neuf (19) souches (coques et bacilles) par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les isolats identifiés étaient des coques et des bacilles appartenant aux six genres ; *Lactobacillus* (42,10%), *Leuconostoc* (21,05%), *Enterococcus* (15,78%), *Pediococcus* (10,52%), *Lactococcus* (05,26%) et *Bifidobacterium* (05,26%). Cette identification prouve que la flore lactique existante dans les fromages est très diverse et les proportions trouvées varient d'un type à un autre.

L'étude des aptitudes technologiques a montré que le genre *Lactobacillus* possède un pouvoir acidifiant important avec un degré d'acidité qui se varie de 40°D à 67°D après 24 h d'incubation à 37°C. Les espèces appartenant au genre *Pediococcus* ont un pouvoir acidifiant très proche de celui des lactobacilles (64°D et 65°D après 24 h d'incubation) et c'est

beaucoup plus stable. Cette aptitude est faible pour les espèces appartenant *Enterococcus* (25°D) et moyenne pour les *Leuconostocs* (entre 30°D et 44°D).

Le pouvoir protéolytique traduit par apparition d'un halo clair sur milieu MRS et M17 additionnés de lait écrémé, est important pour les lactobacilles avec des diamètres allant de 16 à 18 mm supérieur à celui des espèces d'*Enterococcus* et *Leuconostoc* avec 12 à 14 mm sauf pour l'espèce *E. hirae* où elle atteint 19,5 mm. La seule souche appartenant au genre *Lactococcus* possède un pouvoir protéolytique faible (12 mm). Une valeur de $15,50 \pm 2,12$ mm a été mesurée pour *Pc. pentosaceus* ssp. *intermedius*. La production d'acétoïne a été remarquée chez toutes les espèces du genre *Lactobacillus*, et se diffère d'une espèce à une autre pour les *Enterococcus* et les *Leuconostocs*. Le pouvoir aromatisant des pediococques est faible.

Les souches du genre *Lactobacillus* sont douées aussi d'une activité antibactérienne. L'espèce *Lb. plantarum* a inhibée la croissance d'*E. coli* (DH5), *L. monocytogenes* ATCC, *S. aureus* CIP 4.83 et *B. cereus* avec des diamètres entre 16 et 30 mm. *Lb. rhamnosus* et *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis d'*E. coli* (DH5), *L. monocytogenes* ATCC et *B. cereus* avec des valeurs d'inhibition entre 15 et 30 mm. Une seule souche de *Lactobacillus* ssp. a présenté une inhibition de *B. subtilis* ATCC6633 (12 mm), avec une inhibition de *L. monocytogenes* ATCC et *B. cereus* (15 et 11 mm). L'activité antibactérienne de l'espèce *Pc. pentosaceus* ssp. *intermedius* n'est obtenue qu'avec *L. monocytogenes* ATCC (17,5 mm diamètre d'inhibition). L'effet antibactérien a été noté pour *E. coli* (DH5) par les espèces : *Ln. kimchii*, *Pc. Pentosaceus* ssp. *intermedius* et *Lc. piscium* (11, 12 et 12 mm respectivement), pour *L. monocytogenes* ATCC par les espèces *E. avium*, *Ln. mesenteroide* ssp. *mesenteroide*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *Pc. Pentosaceus* ssp. *intermedius* et *Ln. kimchii* et pour *B. cereus* par les espèces *Ln. argentinum* et *Pc. Pentosaceus* ssp. *intermedius*.

D'après ces résultats nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante, l'activité protéolytique et antibactérienne. Cependant, les lactobacilles avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

Les résultats suggèrent que les populations bactériennes ayant une importance industrielle devraient être préservées afin de protéger les fromages traditionnels au lait cru et

de pouvoir les exploiter par le biais de réaction continue glycolyse, protéolyse et lipolyse. Les bactéries lactiques contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques.

Des alternatives peuvent être proposées pour continuer ce travail pour :

- Identification génétique des souches lactiques isolées.
- Etablissement des profils protéiques des souches isolées par les techniques (SDS-PAGE, HPLC).
- La sélection des souches ayant un pouvoir acidifiant pour une éventuelle utilisation comme ferments pour fabriquer des produits de transformation du lait en Algérie.
- La purification partielle ou complète des agents inhibiteurs, l'analyse de leurs structures chimiques et l'identification du déterminant génétique.
- L'utilisation de nouvelles méthodes afin de comprendre les interactions entre les différentes populations microbiennes dans les fromages. Cela permettra d'ouvrir possibles nouvelles façons de gérer les risques et les avantages de la ferme au fromage traditionnel affiné.
- Etude *in vitro* des propriétés probiotiques des souches possédant des bonnes aptitudes.

La connaissance de nouvelles souches de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie agroalimentaire offre une nouvelle voie dans le domaine de la recherche scientifique en microbiologie appliquée dont le but de produire à l'avenir de nouveaux produits alimentaires concurrentiels sur le plan national et international.

Références
Bibliographiques

A

ADAMS M.R. and MOSS M.O., 2008. Chapter 7 - Bacterial agents of foodborne illness. Dans: Adams, M.R., O Moss, M. (Eds.), *Food Microbiology. RSC Publishing, Cambridge, UK.*, pp. 182-269.

AISSAOUI ZITOUN O., 2004. Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle algérien « *Bouhezza* ». *Mémoire de Magister*. Université Mentouri de Constantine. 134p.

AISSAOUI ZITOUN O., 2014. Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle *Bouhezza*. *Thèse de doctorat*. INATAA, Université Mentouri Constantine. 173p.

AISSAOUI ZITOUN O., BENATALLAH L., GHENNAM E. and ZIDOUNE M.N., 2011. Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened *Bouhezza* cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol.9 (2): 96-100.

AISSAOUI ZITOUN O., FUCA N., PEDILIGGIERI C., TUMENELLO L., ZIDOUN M.N., LICITRA G. and CARPINO S., 2011b. Ecosystem characterization of « goatskin » biofilm. *Poster IDF World Dairy Congress, Athens, Greece, May 16-18, 2011*.

AISSAOUI ZITOUN O., PEDILIGGIERI C., BENATALLAH L., LORTAL S., LICITRA G., ZIDOUNE M.N and CARPINO S., 2012. *Bouhezza*, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goat skin bags. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(2) :289-295.

AISSAOUI ZITOUN O. et ZIDOUNE M.N., 2006. Le fromage traditionnel algérien *Bouhezza*. Séminaire d'Animation Régional Technologies douces et procédés de séparation. *AUF-GP3A-INSAT*, Tunis, Tunisie, 118-124.

ALAIS C., 1975. Sciences du lait. Principes des techniques laitières. *Edition Sepaic*, Paris.

ALAIS C., 1984. Science du lait. *Sépaic*, Paris.

ALAIS C. et LINDEN G., 1993. Biochimie alimentaire. *Masson*, 2^{ème} édition. Paris.

ALAIS C. et LINDEN G., 2004. Biochimie alimentaire. 5^{ème} Ed: *Lavoisier*. Paris. 520p (162-164).

AMATAYAKUL T., HALMOS A.L., SHERKAT F. and SHAH N.P., 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. Vol. 16, 40-51.

AMBADOYIANNIS G., HATZIKAMARI M., LITOPULOU-TZANETAKI E. and TZANETAKIS N., 2005. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnol.* 18, 307–325.

AMMOR S., RACHMAN C., CHAILLOU S., PRE'VOST H., DOUSSET X., ZAGOREC M., DUFOUR E. and CHEVALLIER I., 2004. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* 05-11.

AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. and CHEVALLIER I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control.* vol. 17, 454-461.

ANTONIO M.A.D., HAWES S.E. and HILLIER S.L., 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*; 180: 1950-6.

APHA, 2004. Standard methods for the examination of dairy products. (a) Moisture/solids, Forced Draft Oven, Milk (Class A1), Other products (Class B), pp.449-451. (b) Chloride (Salt) Volhard Method (Class 0), pp.387-389. (c) Acidity, Titratable-Phenolphthalein indicator (Class 0), pp.364-366.

ARIZCUN C., BARCINA Y. and TORRE P., 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 38: 17–24.

AVRIL D. and DENIS M. 1992. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek. J.* 70: 331-345.

B

- BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. et OUZROUT R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.
- BALAKRISHNAN G. and AGRAWAL R., 2014. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *J Food Sci Technol* 51(12):4138–4142.
- BAREFOOT S.F. and KLAENHAMMER T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
- BELBELDI A., 2013. Contribution à la caractérisation du fromage *Bouhezza*: Contenu lipidique et vitamines. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri de Constantine. 59p.
- BELLENGIER P., RICHARD J. and FOUCAUD C., 1997a. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *Journal of Dairy Science*, 80, 1520–1527.
- BELLENGIER P., RICHARD J. and FOUCAUD C., 1997b. Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 95–103.
- BELYAGOUBI L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. *Thèse de Doctorat en Biologie*. Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen. 170p.
- BENMASSAI W. et FATHALLAH Z., 2009. Suivi des caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de Bouhezza au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). *Mémoire d'ingénieur*. Université Mentouri Constantine, 86p.
- BERESFORD T.P., FITZSIMMONS N.A., BRENNAN N.L. and COGAN T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology, *Int. Dairy. J.*, 11, pp. 259-274.
- BERTRAND F., 1988. Le fromage grand œuvre des microbes. *Revue générale de froid*, 78,519-527.

BINTSIS T., VAFOPOULOU-MASTROGIANNAKI A., LITOPOULOU-TZANETAKI E. and ROBINSON R.K., 2003. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *J. Appl. Microbiol.* 95, 68–77.

BJÖRKROTH J. and HOLZAPFEL W., 2003. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: M. Dworkin (Ed.) *The Prokaryotes*, 3rd ed. (electronic version). *Springer-Verlag. New York, NY*.

BLICKSTAD E. and MOLIN G., 1981. Growth and Lactic Acid Production of *Pediococcus pentosaceus* at Different Gas Environments, Temperatures, pH Values and Nitrite Concentrations. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 13:170-174.

BLOCK S.S., 1991. Peroxygen compound. In: disinfection, sterilization and preservation. *ed. Lea and Feabiger, Philadelphia*. pp 169-180.

BOOTH J.R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. 49, 359-364.

BOURAYOU F.Z., 2014. Caractérisation de fromage traditionnel algérien « Bouhezza » du commerce fabriqué dans des chekouates et dans des sacs en toile. *Mémoire d'ingénieur*. Université Mentouri de Constantine. 55p.

BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F. et ZOUCCA., 1996. Microbiologie Alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris.

BRULE G., LENOIR J. et REMEUF F., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait, in : Eck, A., et Gillis, J.C. *Le fromage* pp 7-41. *Tec et Doc Lavoisier*, France.

C

CAKMAKCI S., DAGDEMIR E., HAYALOGLU A.A., GURSES M. and GUNDOGDU E., 2008. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World J Microbiol Biotechnol*. 24:293-299.

CALLON C., MILLET C. and MONTEL M.C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res*. 71:231–244.

CARAFI I., NARDIN T., LARCHER R., VIOLA R., TUOHY K. and FRANCIOSI E., 2015. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food Microbiology* 48: 123-132.

CARDOSO V.M., BORELLI B.M., LARA C.A., SOARES M.A., PATARO C., BODEVAN E.C. and ROSA C.A., 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International* 69: 331–340.

CARIDI A., MICARI P., CAPARRA P., CUFARI A. and SARULLO V., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200.

CASALTA E., VASSAL Y., DESMAZEAUD M.J. and CASABIANCA F., 1995. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technology* 28, 291-299.

CASTBERG H.B. and MORRIS H.A., 1976. Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese-making. *A review. Milchwissenschaft* 31: 85-90.

CAVICCHIOLI V.Q., DORNELLAS W.D.S., PERIN L.M., PIERI F.A., DE MELO FRANCO B.D.G., TODOROV S.D. and NERO L.A., 2015. Genetic Diversity and Some Aspects of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk. *Appl Biochem Biotechnol* 175 : 2806–2822.

CHAMMAS G.I., SALIBA R. and BÉAL C., 2006. Characterization of the fermented milk “Laban” with sensory analysis and instrumental measurements. *Food Sci.* 71: S156–S162.

CHAVARRI E.J., NUNEZ J.A. and NUNEZ M., 1983. Behavior of *Streptococcus lactis* in heat treated (80 °C for 30 min) or sterilized cow's or ewe's milk. *Journal of Dairy Research*, 50, 357-363.

CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J.C., LAMBERET G., LENOIR J. et TOURNEUR C., 1984. Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage ; in : « Le Fromage ». *Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.*

CHRISTIANSEN P.S., EDELSTEN D., KRISTIANSEN J.R. and NIELSEN E.W., 1996. Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 51: 502-504.

COELHO M.C., SILVA C.C.G., RIBEIRO S.C., DAPKEVICIUS M.L.N.E. and ROSA H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*: 191. 53–59.

COGAN T. M. and JORDAN K. N., 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77, 2704–2717.

COLLINS M.D., FARROW J.A.E. and JONES D., 1986. *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 36:8–12.

COLLINS M.D., JONES D., FARROW J.A.E., KILPPER-BALZ R. and SCHLEIFER K.H., 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. Nov. *Int J Syst Evol Bacteriol.* 34(2):220–223.

COLLINS M.D., SAMELIS J., METAXOPOULOS J. and 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.* (75): 595-603.

CORBIER C., KRIER F., MULLIERT G., VITOUX B. and REVOL-JUNELLES A.M., 2001. Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52b and leucocin b-ta33a. *Applied and Environmental Microbiology.* 67, 4, 1418-22.

CORROLER D., DESMASURES N. and GUÉGUEN M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 91-99.

CORROLER D., MANGIN I., DESMASURES N. and GUEGUEN M., 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol* 64, 4729-4735.

D

- DALMASSO M., PRESTOZ S., RIGOBELLO V. and DEMARIGNY Y., 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International* 14, 469-477.
- DE AMBROSINI V.M., GONZALEZ S., PERDIGON G., DE RUIZ HOLGADO A.P. and OLIVER G., 1996. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 44(12): 2263–2267.
- DEETH H.C. and TOUCH V., 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55: 153–168.
- DELLAGLIO F., DE ROISSARD H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.
- DEMIRCI Y. and HEMME D., 1994. Growth of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from French raw milk cheeses in a reference milk. *Milchwissenschaft*, 43, 483–485.
- DE ROISSARD H. et LUQUET F.M., 1994. Bactéries lactiques. 2volumes, *Lorica Uriage*, 600 p. par volume.
- DESMASURES N., BAZIN F. and GUEGUEN M., 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms the camembert region, *J. Appl. Microbiol.* V.83, n°1, 53-58.
- DICKS L.M.T., FANTUZZI L., GONZALEZ F.C., DU TOIT M. and DELLAGLIO F., 1993. *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from argentine raw milk. *Int J Syst Bacteriol.* 43:347–351.
- DONKOR O.N., HENRIKSSON A., VASILJEVIC T. and SHAHA N.P., 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences.* 86: 21-38.
- DORTU C. et THONART P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 13(1) : 143-154.

DOS SANTOS K.M.O., VIEIRA A.D.S., COSTA ROCHA C.R., DO NASCIMENTO J.C. F., DE SOUZA LOPES A.C., BRUNO L.M., CARVALHO J.D.G., DE MELO FRANCO B.D.G. and TODOROV S.D., 2014. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Ann Microbiol.* 64:1463–1471.

DURLU-ÖZKAYA F., ASLIM B. and TAHA OZKAYA M., 2007. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT -Food Science and Technology.* Vol. 40, 564-568.

E

ECK A., 1990. Le Fromage 3^{ème} Edition, *Techniques et Documentation, Lavoisier*, Paris.

EDIMA H.C., 2007. *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. *Thèse de doctorat.* INPL et PhD. Université de Ngaoundéré.165p.

EKLUND T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology.* 1, 4, 179-185.

EL-GHAISH S., AHMADOVA A., HADJI-SFAXI I., EL MECHERFI K.E., BAZUKYANE I., CHOISSET Y., RABESONA H., SITOHY M., POPOV Y.G., A. KULIEV A., MOZZI F., CHOBERT J.M. et HAERTLÉ T., 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Tre. Food Sci. Technol.* 1-8.

ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K. and ISHIZAKI A., 2000. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure, and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85–106.

F

FARKYE N.Y., MADKOR S.A. and ATKINS H.G., 1995. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *Int Dairy J* 5: 715-725.

FARROW J.A.E. and COLLINS M.D., 1985. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol.* 35:73–5.

FENNEMA O.F., HUI Y.H., KAREL M., WALSTRA P. and WHITAKER J.R., 2004. Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. *Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; P. 19–30.

G

GALVEZ A., ABRIOUEL H., BEN OMAR N. and LUCAS R., 2011. Food Applications and Regulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp, 253-390.

GILAROVÁ R., VOLDRICH M., DEMNEROVÁ K., CEROVSKÝ M. and DOBIÁS J., 1994. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 24(12): 315–319.

GILLILAND S.E. and SPECK M.L., 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in non fermented refrigerated foods. *J Food Sci* 40:903-905.

GOMES A.M.P. and XAVIER MALCATA F., 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis *via* technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1992-1507.

GROSU-TUDOR S.S., STANCU M.M., PELINESCU D. and ZAMFIR M., 2014. Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2459–2469.

GUDKOW A.V., 1987. Starters as mean controlling contaminating organisms. *Milk- the vital force*. pp. 83-93.

GUESSAS B., HADADJI M., SAIDI N. and KIHAL M., 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.

GUIRAUD J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. *1e Ed.*, Dunod. Paris. 136-144.

GUIRAUD J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod*. Paris. 90-292.

GUIRAUD J. et GALZY P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Edition l'usine*. 119p.

GUIRAUD J.P. et ROSEC J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 237-251.

GULAHMADOV S.G.O., BATDORJ B., DALGALARRONDO M., CHOBERT J.M., KULIEV A. A.O.K. and HAERTLÉ T., 2006. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. *Eur Food Res Technol*. 224: 229–235.

H

HADDIE J.M., 1986. Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1: 1070.

HAJJ SEMAAN E., DIB H., ABI RAMIA R. et CHEDID M., 2011. Caractérisation chimique et qualité bactériologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais. *Lebanese Science Journal, Vol. 12, No. 1*.

HAMMES W.P. and HERTEL C., 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap. 1.2.10. *In prokaryotes*. 4: 320-403.

HAMMES W.P. and VOGEL R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. *In: B. J. B. Wood and W. H. Holzapel (Eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Elsevier Applied Science Publishers*. London, UK. 19–54.

HARAMI A. et HORFI M., 2006. Contribution à la connaissance du camembert « Numidia ». *Mémoire d'ingénieur d'état en industrie agroalimentaire*. Université Mentouri de Constantine. 50p.

HASSAN A.N. and FRANK J.F., 2001. Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., *Marcel Dekker, Inc*. New York. 151-205.

HELENI S., LEFKI P., NIKOLAOS T. and EVANTHIA L.T., 2006. Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Int. J. Dairy Technol*. vol. 59, no3, pp. 200-208.

HELLER K.J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374S-379S.

HELLIG L.F., D'AMBROSIA R., DRAKE A.L. and DELLAVALLE R.P., 2005. Inhibitory Effect of Metabolites from Probiotics *Lactobacillus acidophilus* Strains on Growth of Pathogenic Bacteria. *J. Pharmacol. and Toxicol.* 6: 533-540.

HEMME D. and FOUCAUD-SCHEUNEMANN C., 2004. Review *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14, 467–494.

HERRERO M., MAYO B., GONZALEZ B. and SUAREZ J.E., 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation, *J. Appl. Bacteriol.*, 81, pp. 565-570.

HOGG T., 2005. Essential microbiology. *John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

HO T.N.T., TUAN N., DESCHAMPS A. and CAUBET R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.

HOLT G.J., KRIEG N.R. SNEATH P.H.A., STALEY J.T. and WILLIAMS S.T., 1994. Gram positive cocci. In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed., pp. 527). Baltimore: *Williams & Wilkins*.

HURST A., 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85-123.

HUTKINS R.W. and PONNE C., 1991. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 941-4.

J

JEANSON S., 2000. La maturation du lait dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite : le rôle des lactocoques. *Thèse de doctorat.* Université de Dijon, France. 243p.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MADRANT., SCHUCK P. et BRULE G., 2008. Les produits laitiers, 2^{ème} édition *TEC et DOC Lavoisier*, 185p.

JINET A., CHAMPAGNE C.P., GIRARD F. and MORIN N., 1996. Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.* 10: 463.

K

KANDLER O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.

KHALID N.M. and MARTH E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.

KHAN S.H. and ANSARI F.A., 2007. Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1): 76-82.

KLAENHAMMER T.R., AZCARATE-PERIL M.A., ALTERMANN E. and BARRANGOU R., 2007. The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics*, 137: 748S-750S.

KÖNIG H. and FRÖHLICH J., 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

KUNJI E.R., MIERAU I., HAGTING A., POOLMAN B. and KONINGS W.N., 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187–221.

L

LAFARGE V., OGIER J.C., GIRARD V., MALADEN V., LEVEAU J.Y., GRUSS A. and DELACROIX-BUCHET A., 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 5644-5650.

LAHTINEN S., SALMINEN S., OUWEHAND A. and WRIGHT A.V., 2011. Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects. 4th ed. Boca Raton: CRC Press.

LANE C.N. and FOX P.F., 1996. Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 6, 7, 715-728.

LARPENT J.P., 1997. Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier*. Paris. 10-72.

LARPENT J.P. and LARPENT G.M., 1990. Mémento technique de microbiologie 2^{ème} Ed. *Technique et documentaire lavoisier*, Paris, P: 417.

- LAW B.A. and KOLSTAD J., 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 225-245.
- LAW J. and HAANDRIKMAN A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.
- LECLERC H., GAILLARD F.L. et SIMONET M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445.
- LEMOUCHI L., 2007. Le fromage traditionnel *Bouhezza* : enquête de la Wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri Constantine. 65p.
- LENOIR J., 1962. Note sur la dégradation des protides qu cours de la maturation du camembert (*). Extrait de la revue le lait mars-avril, 1963, pp. 1-11 (*) C. R. Acad. Agr., 1962, 48, n° 03, 160.
- LENOIR J., LAMBERT G. et SCHMIODT J.L., 1983. L'élaboration d'un fromage : l'exemple du *Camembert*. *Pour la Science*, 69, 30-42.
- LEVEAU J.Y. et BOUIX M., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 85-87.
- LEVEAU J.Y., BOIUX M. et De ROISSART H.B., 1991. La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaires. 2^{ème} Ed., *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3: 2-40.
- LICITRA G., 2010. World-wide traditional cheeses: Banned for business. *DairySci. Technol.* 90, 357–374.
- LITOPOULOU-TZANETAKI E. and TZANETAKIS N., 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101. 17– 32.
- LUQUET F.M. et CORRIEU G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. *Santé et Nutrition*. France.

LYNCH C.M., MC SWEENEY P.L.H., FOX P.F., COGAN T.M. and 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.

M

MAGHNIA D., 2011. Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens. *Mémoire de magister en Microbiologie Alimentaire*. Université d'Oran-Es-Senia. 126p.

MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. *Tec & Doc Lavoisier*. 194p.

MAKHLOUFI K.M., 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. *Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie*. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.

MAMI A., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. *Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée*. Université d'Oran. 176p.

MARILLEY L. and CASEY M.G., 2004. Review article: Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90 : 139– 159.

MATAMOROS S., 2008. Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. *Thèse de Doctorat en Microbiologie*. Université de Nantes. 189p.

MAURY M., 1987. Milieux et réactifs de laboratoire. *Microbiologie et immunologie Diagnostic Pasteur*, 727.

MÄYRÄ-MÄKINEN A. and BIGRET M., 2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., *Marcel Dekker, Inc*. New York. 73-102.

- MC CARTHY C.M., WILKINSON M.G., KELLY P.M. and GUINEE T.P., 2015. Effect of salt and fat reduction on the composition, lactose metabolism, water activity and microbiology of Cheddar cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 015-0245-2.
- MC SWEENEY P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Technol* 57: 127-148.
- MC SWEENEY P.L.H. and SOUSA M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80: 293-324.
- MEDJOUDJ H., (en cours). Contribution et caractérisation du fromage traditionnel : *Bouhezza*. Thèse de doctorat. INATAA, Université Mentouri Constantine.
- MEKENTICHI, 2003. Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (*Bouhezza*). Thèse. Dépt. Agronomie. Université de Batna, Algérie.
- MIETTON B., 1995. Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. *Revue des ENIL*, 189, 19-27.
- MKRTCHYAN H., GIBBONS S., HEIDELBERGER S., ZLOH M. and LIMAKI H.K., 2010. Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, 35: 255-260.
- MOELLER V., 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 36:158-172.
- MOLIMARD P. and SPINLER H.E., 1996. Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J Dairy Sci* 79: 169-184.
- MONNET V., LATRILLE E., BEAL C. et CORRIEU G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 512-592.
- MONTEL M. C., BEUVIER E. et HAUWUY A., 2003. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *Séminaire INRA-INAO* Systèmes d'élevage et typicité des produits laitiers 15-16 janvier 2003.

MONTVILLE T.J., MEYER M.E., HSU A.H.M. and HUANG G.T.C., 1987. High pressure liquid chromatography and wide bore capillary gas-liquid chromatography methods for quantification of acetoin and diacetyl from bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods* 7: 1- 8.

MOON S.K., WEE Y.J. and CHOI G.W., 2012. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 114 No. 2, 155-159.

MUCCHETTI G., GHIGLIETTI R., LOCCI F., FRANCOLINO S., BONVINI B., REMAGNI M.C., ZAGO M., IEZZI R. and CARMINATI D., 2009. Technological, microbiological and chemical characteristics of Pannerone, a traditional Italian raw milk cheese. *Dairy Sci. Technol.* 89. 419–436.

N

NAYRA S., SHARAF O.M., IBRAHIM G.A. and TAWFIK N.F., 2002. Incorporation and viability of some` probiotic bacteria in functional dairy food: I. Soft cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30: 217-229.

NEVILLE M.C. and JENSEN R.G., 1995. Hand book of milk, the physical proprieties of human and bovin milk. Ed JENSON. *Acadimic press*, 592p.

NINANE V., MUKANDAYAMBAJE R. et BERBEN G., 2009. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 13(3) : 459–466.

O

OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. and SAÏHI A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286-290.

OLIVEIRA M.N., SODINI I., REMEUF F. and CORRIEU G., 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 935-942.

ORDOTIEZ J.A. and ORTIZ DE APODACA M.J., 1977. Lipolytic activity of micrococci isolated from cheese. *Milchwissenschaft*, 32, 531-3.

ORLA-JENSEN S., 1919. The lactic acid bacteria. A.F. hostand son, Koenighichen Hof-Boghamdel, Copenhagen.

ORTIZ DE APODACA M.J., SELGAS M.D. and ORDOIEZ J.A., 1993. Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Research International*. 26: 319-325.

P

PAPAGIANNI M. and ANASTASIADOU S., 2009. Pediocins: the bacteriocins of pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8:1–16.

PATEL S., MAJUMDER A. and GOYAL A., 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol*. 52(1):3–12.

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.

PIARD J.C. and DESMAZEAUD M.J., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. bacteriocins and other antimicrobial substances. *Le Lait*. 72, 113-142.

PIARD J.C., MURIANA P.M., DESMAZEAUD M.J. and KLAENHAMMER T.R., 1992. Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CNRZ 481. *Applied Environmental Microbiology*. 58, 1, 279-284.

PILET M.F., MAGRAS C. et FEDERIGHI M., 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.

POGACIĆ T., MANCINI A., SANTARELLI M., BOTTARI B., LAZZI C., NEVIANI E. and GATTI M., 2013. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology* 36, 207-215.

POOLMAN B., 1990. *Molecular Microbiology*, 4, 1629-36.

POT B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris.1-106.

POT B., DEVRIESE L.A., URIS D., VANDAMME P., HAESEBROUCK F. and KERSTERS K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 213-222.

PRINGSULAKA O., THONGNANGAM N., SUWANNASAI N., ATTHAKOR W., POTHIVEJKUL K. and RANGSIRUJI A., 2011. Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: 547-551.

R

RACCACH M., 1987. Pediococci and biotechnology. *Crit Rev Microbiol* 14:291–309.

RACCACH M., BAKER R.C., REGENSTEIN J.M. and MULNIX E.J., 1979. Potential application of microbial antagonism to extended stability of a flesh type food. *J Food Sci* 44:43-46.

RAMET J., 2009. L'égouttage du coagulum. In: Eck A, Gillis JC, editors. *Le fromage*. 3rd ed. Paris, France: *Lavoisier Tec & Doc*. pp. 42-61.

REHMAN S-UR., MCSWEENEY P.L.H., BANKS J.M., BRECHANY E.Y., MUIR D.D., FOX P.F., 2000. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal*. 10 : 33-44.

REIS J.A., PAULA A.T., CASAROTTI S.N. and PENNA A.L.B., 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev* 4:124–140.

REITER B.T., FRYER T.F., PICKERING A., CHAMPAN H.R., LAWRENCE R.C. and SHARPE M.E., 1967. The effect of the microbial flora on the flavor and free fatty acid composition of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 34, 251-272.

RHIAT M., LABIOUI H., DRIOUICH A., AOUDANE M., CHBAB Y., DRIOUICH A., MENNANE Z. et OUHSSINE M., 2011. Étude bactériologique comparative des fromages

frais marocains commercialisés (Mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire. *Afrique SCIENCE* 07(3) : 108 – 112.

RICHARD J. et ZADI H., 1983. Inventaire de la flore bactérienne : domaine des camemberts fabriqués avec du lait cru. *Le lait*, 63, 25.

ROLIM F.R.L., SANTOS K.M.O., BARCELOS S.C., EGITO A.S., RIBEIRO T.S., CONCEIÇÃO M.L., MAGNANI M., OLIVEIRA M.E.G. and QUEIROGA R.C.R.E., 2015. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology* 63, 807-813.

ROUDJ S., BELKHEIR K., ZADI-KARAM H. et KARAM N.E., 2009. Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* 34 (2): 218-227.

ROUISSAT L. and BENSOLTANE A., 2006. Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567-582.

RUAS-MADIEDO P., ALTING A.C. and ZOON P., 2005. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *International Dairy Journal*. Vol. 15, 155-164.

RUAS-MADIEDO P., HUGENHOLTZ J. and ZOON P., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. Vol. 12, 163-171.

S

SABLÉ S., PORTRAIT V., GAUTIER V., LETELLIER F. and COTTENCEAU G., 1997. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* 21:212-220.

SAIDI N., GUESSAS B., BENSALAH F., BADIS A., HADADJI M., HENNI D.E., PREVOST H. et KIHAL M., 2002. Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11.

- SALMINEN S., WRIGHT A.V. and OUWEHAND A., 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc.*, U.S.A.
- SAMELIS J., MAUROGENAKIS F. and METAXOPOULOS J., 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23, pp. 179-196.
- SAOUDI Z., 2012. Caractérisation microbiologique de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « *Bouhezza* » de ferme. *Thèse de magistère*. INATAA. Université Mentouri Constantine. 90p.
- SARANTINOPOULOS P., ANDRIGHETTO C., GEORGALAKI M.D., REA M.C., LOMBARDI A., COGAN T.M., KALANTZOPOULOS G. and TSAKALIDOU E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11, 621–647.
- SCHILLINGER U., GEISEN R. and HOLZAPFEL W.H., 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-64.
- SCHLEIFER K.H., 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 46 : 201-203.
- SCHLEIFER K.H. and KLOOS W.E., 1975. A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* 1, 337-8.
- SENOUSSI A., 2013. Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel Algérien « *Bouhezza* ». *Mémoire de Magister*. INATAA. Université Mentouri de Constantine. 72p.
- SERHAN M., 2008. Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage *Darfiyeh* et établissement de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine *Thèse de doctorat de l'INPL*. 199p.

SERVER-BUSSON C., FOUCAUD C. and LEVEAU J.Y., 1999. Selection of dairy *Leuconostoc* isolates for important technological properties. *Journal of Dairy Research*, 66, 245–256.

SIEGUMFELDT H., RECHINGER K.B. and JAKOBSEN M., 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2330-2335.

SOOMRO A.H., MASUD T. and ANWAAR K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1): 20-24.

STADHOUDERS J. and MULDER H., 1958. Fat hydrolysis and cheese flavor. II. Microorganisms involved in the hydrolysis of fat in the interior of the cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 12, 23741.

STANLEY G., 1998. Cheeses. B. J. B. Wood (ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. 263-307.

STARON T., 1979. La culture des moisissures. Dans microbiologie et industrie alimentaire. *Apria*, p.123.

ST GELAIS D., BABA ALI O. et TURCOT S., 2000. Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation.

STILES M.E. and HOLZAPFEL W.H., 1997. Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

T

TAGG J.R. and MC GIVEN A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21: p943.

TAILLIEZ P., 2004. Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques*. 35-41.

TAMIME A.Y., 1990. Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. (Ed), *Dairy Microbiology*, vol. 2. *Elsevier, London*. pp. 131- 201.

TAMIME A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3rd Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.261-366.

TAYLOR M.J., BANDI C. and HOERAUF A., 2005. Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv in Parasitol.* 60: 245-284.

TEIXEIRA L.M., CARVALHO M.G.S. and FACKLAM R.R., 1999. *Vagococcus*. In Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson R.K. Oxford, Elsevier. 2215-2220.

TOSUKHOWONG A., NAKAYAMA J., MIZUNOE Y., SUGIMOTO S., FUKUDA D. and SONOMOTO K., 2005. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophile* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* 99: 30-37.

TOUATI W., 2008. Evolution des flores microbiennes du fromage traditionnel *bouhezza* durant 70 jours et identification de sa flore lactique. *Mémoire d'ingénieur*, INATAA Université Mentouri Constantine, 51p.

U

UEHARA S., MONDEN K., NOMOTO K., SENO Y., KARIYAMA R. and KUMON H., 2006. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.

V

VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI A., LITOPOULOU-TZANETAKII E. and TZANETAKIS N., 1994. Proteinase, peptidase and esterase activity of crude, cell free extracts of *Pediococcus pentosaceus* isolated from cheese. *Lebensm.-Wissen. Technol.* 27:342–346.

VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DEVOS P., KERESTERS K. and SWWINGS J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407.

VANDENBERGH P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews.* 12, 1-3, 221-237.

VEDAMUTHU E.R., 1994. The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77, 2725–2737.

VEISSEYRE R., 1975. Technologie du lait. 3^{ème} édition. *La Maison Rustique*, Paris, 713 p.

VEUILLEMARD J.C., 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3 : 1-65.

VIGNOLA C.L., 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait. *Presses internationales polytechnique*, Québec; 608p.

W

WELMAN A.D. and MADDOX I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. Vol. 21, 269-274.

X

XANTHOPOULOS V., POLYCHRONIADOU A., LITOPOULOU-TZANETAKI E. and TZANETAKIS N., 2000a. Characteristics of Anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter. *Lebensm. Wis. Technol.* 33, 483–488.

XANTHOPOULOS V., HATZIKAMARI M., ADAMIDIS T., TSAKALIDOU E., TZANETAKIS N. and LITOPOULOU-TZANETAKI E., 2000b. Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *J. Appl. Microbiol.* 88, 1056–1064.

Z

ZAIDI O., 2002. Caractérisation du fromage traditionnel *Bouhezza* ; caractérisation physicochimique et microbiologique. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri de Constantine, 51p.

ZAROOUR K., BENMECHERNENE Z., HADADJI M., MOUSSA-BOUDJEMAA B., HENNI J.E. et KIHAL M., 2013. Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostocs mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, (08) 39 - 47.

ZHANG B., TAN Z., WANG Y., LI Z., JIAO Z. and HUANG Q., 2015. Dynamic changes of the microbial communities during the preparation of traditional Tibetan Qula cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 95:167–180.

ZHANG H. and CAI Y., 2014. Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. *Springer Dordrecht Heidelberg*. New York London. 536p.

ZOURARI A., ACCOLAS J.P. and DESMAZEAUD M.J., 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *A review. Lait.* 72: 1-34.

Annexes

Annexe I : Détermination de l'acidité du fromage

- La prise d'essai porte sur 10 g de fromage en comparaison avec un témoin constitué de 10 mL de produit pur pour la matière première. Le titrage est réalisé comme suit :
- compléter avec l'eau distillée jusqu'à 100 mL et homogénéiser l'ensemble ;
- chauffer à 70 à 80°C pour faciliter la solubilisation de l'acide lactique, après filtration, prélever 25 mL ;
- ajouter à la solution 0,3 mL de la solution de phénolphtaléine à 1% ;
- titrer avec la soude (NaOH N/9) jusqu'au virage au rose de la solution qui doit persister pendant une dizaine de secondes en comparant avec un témoin ;
- ramener la concentration finale de l'acide dans la solution mère en gramme d'acide lactique pour cent gramme de fromage et de matière sèche ou en degré Dornic.

Annexe II : Coloration de Gram

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

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

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

ANNEXE III. Tables d'identification des bactéries lactiques

I-Tables d'identification de DE ROISSARD et LUQUET (1994)

Tableau 1. Caractéristiques physiologiques du genre *Lactobacillus* du Groupe I

ESPECES	MOBILITE	CROISSANCE A/(DANS)						Température optimale de croissance	Température maximale de croissance
		15°C	45°C	pH 3,3	pH 7	4% NaCl	10% NaCl		
<i>Lb.acidophilus</i>	-	-	+	-	+			45°C	52°C
<i>Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus</i>	-	-	+					45°C	52°C
<i>Lb.delbrueckii ssp.delbrueckii</i>	-	-	+					45°C	52°C
<i>Lb.delbrueckii ssp.lactis</i>	-	-	+					45°C	52°C
<i>Lb.gasseri</i>	-	-	+	-	+	V(+)		35-38°C	
<i>Lb.helveticus</i>	-	-	+	-	+				
<i>Lb.kefiranofaciens</i>	-	-	-						

Tableau 2. Profil fermentaire du genre *Lactobacillus* du groupe I

ESPECES	Hydrolyse de l'Esculine	Production d'acide par fermentation de :									
		Amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Saccharose	Xylose
<i>Lb.acidophilus</i>	+	+	-	+	V	+	+	+	-	+	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.delbrueckii</i>	-	-	-	V	+	-	-	V	-	+	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.lactis</i>	-	+	-	V	+	V	+	+	-	+	-
<i>Lb.gasseri</i>	+	+	-	+	+	+	V	v	-	+	-
<i>Lb.kefiranofaciens</i>	-	-	-	-	+		+	+	-	+	-

Tableau 3. Caractéristiques physiologiques du genre *Lactobacillus* du groupe II

ESPECES	MOBILITE	CROISSANCE A (DANS)						Température optimale de croissance	Température maximale de croissance
		15°C	45°C	pH 3,3	pH 7	4% NaCl	10% NaCl		
<i>Lb.casei</i>	-	+	v					30-37°C	<45°C
<i>Lb.paracasei ssp.paracasei</i>	-	+	v						
<i>Lb.paracasei ssp.tolerans</i>	-	+	-						<40°C
<i>Lb.plantarum</i>	-	+	-					30-37°C	< 45°C
<i>Lb.rhamnosus</i>	-	+	+						
<i>Lb.sake</i>	-	+	-					30-37°C	<45°C

Tableau 4. Profil fermentaire du genre *Lactobacillus* (groupe II)

ESPECES	de Hydrolyse l'Esculine	Production d'acide par fermentation de :									
		amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Saccharose	Xylose
<i>Lb.casei</i>	+	+	-	+	+	+	-	V	+	-	
<i>Lb.paracasei ssp.paracasei</i>	+	+	V(-)	+	+	+	V(+)	+	+	V(+)	-
<i>Lb.paracasei ssp.tolerans</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb.plantarum</i>	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	V(-)
<i>Lb.rhamnosus</i>	+	+		+	+	+	+	+	+		-
<i>Lb.sake</i>	+	V	V	+	+	+	+	+	-	+	-

Tableau 5. Caractéristiques physiologiques et biochimiques du genre *Leuconostoc*

ESPECES	Pigmentation jaune	Croissance dans/à									Gaz à partir du glucose	Production de bêta-galactosidase	Production de dextrane	Hydrolyse de :	
		NaCl 13%	45°C	NaCl 6,5%	pH 4,8	pH 6,5	< 5°C	15°C	30°C	37°C				Arginine	Esculine
<i>Ln.lactis</i>	-	+-	-	-	+		-		+	-	+		-	-	-
<i>Ln.mesenteroides ssp.cremoris</i>		-	-	-	+		+	+	-		+		-	-	-
<i>Ln.mesenteroides ssp.dextranicum</i>		+-	-	-	+		+		+		+		+	-	+-
<i>Ln.mesenteroides ssp.mesenteroides</i>	-	+	+-	-	+		+		+-	-	+		+	-	+-
<i>Ln.paramesenteroides</i>		+-	+-	+-	+			+	+-		+		-	-	+-
<i>Ln.pseudomesenteroides</i>	-						+		+		+		-	-	+-

Tableau 6. Profil fermentaire du genre *Leuconostoc*

ESPECES	Production d'acide par fermentation de :									
	Amygdaline	L-arabinose	Cellobiose	D-Fructose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Saccharose	D-Xylose
<i>Ln.lactis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Ln.mesenteroides ssp.cremoris</i>	-	-	-	-	V	+	V	-	-	-
<i>Ln.mesenteroides ssp.dextranicum</i>	V	-	V	+	V	+	+	V	+	V
<i>Ln.mesenteroides ssp.mesenteroides</i>	V	+	V	+	+	V(+)	+	V	+	V
<i>Ln.paramesenteroides</i>	V(+)	V	V(+)	+	+	V(+)	+	V(+)	+	V
<i>Ln.pseudomesenteroides</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Tableau 7. Caractéristiques physiologiques et biochimiques du genre *Lactococcus*

ESPECES	Mobilité	Pigmentation jaune	Croissance dans/à							Gaz à partir du glucose	Hydrolyse de :		
			NaCl 3%	NaCl 4%	NaCl 6,5%	pH 9,6	10°C	40°C	45°C		Gélatine	Esculine	Hippurate
<i>Lc.garvieae</i>	-	-		+				+				+	V
<i>Lc.lactis ssp.Cremoris</i>	-	-	+	-				+		-		V	+
<i>Lc.lactis ssp.hordniae</i>	-	-	+	-						-		+	-
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>	-	-		+				+	+	-		+	+
<i>Lc.piscium</i>	-	-						+		-		+	
<i>Lc.plantarum</i>	-	-		+				+	V	-		-	+
<i>Lc.raffinolactis</i>	-	-		-				-	-			-	+

II-Table de STILES et HOLZAPFEL (1997)

Tableau 1. Classification des espèces du genre *Lactobacillus*

Group 1	Group 2	Group 3
Obligat homofermenters	Facultative heterofermenters	Obligat heterofermenters
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. aviarius</i>	<i>Lb. bifementans</i>	<i>Lb. fermentum</i>
subsp. <i>araffinosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
subsp. <i>aviarius</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. fructosus</i> ^b
<i>Lb. crispatus</i>	subsp. <i>coryniformis</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	subsp. <i>torquens</i>	<i>Lb. kefir</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb.</i> <i>malefermentans</i>
subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. oris</i>
subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. hamsteri</i>	<i>Lb. panis</i> ^a
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. homohiochii</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. parakefir</i> ^a
<i>Lb. gasserii</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. pontis</i> ^a
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. jensenii</i>	subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	subsp. <i>tolerans</i>	<i>Lb. suebicus</i>
<i>Lb.</i> <i>kefiranofermentans</i>	<i>Lb. paraplantarum</i> ^a	<i>Lb. vaccinofermentans</i>
<i>Lb. kefirgranum</i> ^a	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. plantarum</i>	
<i>Lb. ruminis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	
subsp. <i>salicinus</i>		
subsp. <i>salivarius</i>		
<i>Lb. sharpeae</i>		

ANNEXES IV. Milieux de cultures utilisés pour l'isolement et l'identification des bactéries lactiques du fromage traditionnel Bouhezza

• **Milieu M17 (pH 7,2)**

Peptone papainique de soja	5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone trypsique de caséine	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	2,5 g
β -Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée qsq	950 mL

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min. La solution de lactose est préparée dans l'eau distillée à raison de 5 g dans 50 ml Elle est stérilisée à 110 °C durant 15 min et ajoutée au milieu.

• **Milieu MRS (pH 6,5)**

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80.....	1 mL
Phosphate bipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

• **Gélose hypersaccharosée (pH 6,8)**

Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	3 g
Peptone	2,5 g
Saccharose	150 g
K ₂ HPO ₄	2 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Gibson-Abdelmalek (pH 6,5)**

Extrait de levure	2,5 g
Glucose	50 g
Jus de tomate	100 mL
Lait	800 mL
Gélose nutritive ordinaire	200 mL

Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30 min à 100°C.

- **Gélose au tellurite de potassium (pH 7)**

Extrait de viande	10 g
Glucose	5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose	20 g
Peptone	10 g
Eau distillée qsq	1000 mL
Chlorure de sodium	5 g

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 15 min puis 50 mL d'une solution stérile de tellurite de potassium à 0,8 %.

- **Lait citraté**

Lait écrémé stérile	5 mL
Citrate de sodium	0,25 ml
Gélose blanche	3 mL
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Gélose blanche**

Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Milieu mannitol mobilité (pH 8,1)**

Peptone	20 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1 g
Gélose	4 g
Mannitol	2 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min.

- **Milieu MEVAG (pH 7,7)**

Extrait de viande	3 g
Chlorure de potassium	5 g
Rouge de phénol	20 mg
Gélose	3 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Répartir en tubes à essais (9 mL). Autoclaver 15 min à 120°C. Ajouter avant emploi au milieu en surfusion, 1 mL par tube de solution de substrat carboné à 10% stérilisé par filtration (concentration finale 1%).

- **Gélose nutritive (pH 7,4)**

Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Gélose Muller Hinton**

Extrait de viande	3 g
Hydrolysate acides de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	16 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Bouillon MRS**

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 mL
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate triammonique	0,2 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Saccharose	5 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Bouillon M17 (pH 7,1 ± 0,2)**

Tryptone	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone papainique de soja	5 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	0,5 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Milieu Môeller à l'arginine (pH 6,8)**

Peptone pepsique de viande	5 g
Extrait de viande	5 g

Pourpre de bromocrésol	0,01 g
Rouge de crésol	0,005 g
Glucose	0,50 g
Pyridoxal	0,005 g
Arginine	10 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes

- **Milieu Clark et Lubs (pH 7)**

Peptone	6 g
Glucose	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

- **Eau peptonée (pH 7,2)**

Chlorure de sodium	5 g
Peptone exemple d'indole	10 g
Eau distillée qsp	1000 mL

- **Lait écrémé (pH 7,0)**

Eau distillée qsp	100 mL
Extrait de levure	0,5 g
Lait écrémé	10 g

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

- **Eau physiologique (pH 7)**

Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée qsp	1000 mL
Peptone	0,5 g

- **Bouillon nutritif (pH 7,4)**

Chlorure de sodium	5 g
Extrait de levure	2 g
Extrait de viande	1 g
Peptone	5 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

- **Préparation d'une solution de la nisine**

La nisine se solubilise dans une solution d'H Cl (0,01 N).

Nisine	0,25 mg
Solution d'H Cl (0,01N)	1 mL

Le présent travail fut présenté dans les manifestations scientifiques suivantes:



Séminaire Internationale des Biotechnologies
Constantine 19, 20 et 21 Octobre 2015



ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES SOUCHES DE LACTOBACILLES ISOLEES DU FROMAGE



TRADITIONNEL ALGERIEN « *BOUHEZZA* »

BOULLOUF Amal, LEULMI I, LAZZOUNI I, BETROUCHE A., ZIDOUNE M. N.

Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies
Agro-Alimentaires, Université Mentouri de Constantine, Route Aïn El Bey, Constantine, Algérie.

amalb36@gmail.com

Résumé

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme d'oxygène et des substances naturelles de nature protéique. Leur utilisation pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

Ce travail a été inspiré des résultats obtenus sur l'absence total des pathogènes dans le fromage traditionnel Algérien *Bouhezza*. L'isolement des souches lactiques a été réalisé sur milieu MRS solide à pH 5,5 incubés à 30°C et 40°C en condition d'anaérobiose. L'identification des isolats par coloration de gram, le test de la catalase et les tests biochimiques et physiologiques (croissance à différentes températures ; 10°C, 15°C et 45°C, croissance à 6,5% NaCl et à pH 9,6 et le type fermentaire à partir du glucose) permet de les classer au genre *Lactobacillus*.

L'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des germes pathogènes (Gram positifs et Gram négatifs) est réalisée par la méthode de diffusion en puits. Cette activité est testée pour les surnageants et les suspensions des souches étudiées.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont révélé que toutes les souches de *Lactobacillus* isolées produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibition qui se diffèrent d'une souche à une autre.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de l'activité antibactérienne des lactobacilles dans l'industrie laitière.

Mots clés : Fromage *Bouhezza*, *Lactobacillus*, activité antibactériennes.



The First International Congress of Nutrition & Food Science
« from Bench to Beside »

20, 21 et 22 Novembre 2015 in the auditorium of the Faculty SNV/STU



HYGIENIC QUALITY OF THE TRADITIONAL ALGERIAN CHEESE; *BOUHEZZA* AND
PROTECTIVE ROLE OF ITS LACTIC FLORA

BOULLOUF Amal, LAZZOUNI I., LEULMI I., SAOUDI Z., AISSAOUI ZITOUN O., ZIDOUNE M. N.
*Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-
Alimentaires, Université Mentouri de Constantine, Route Aïn El Bey, Constantine, Algérie.*
amalb36@gmail.com

Abstract

Bouhezza is a traditional Algerian cheese known in the east of Algeria (Oum el Bouaghi, Khenchella, Batna, Biskra, etc...). Its exceptional manufacture is based on the use of a goatskin container with Lben salted and raw cow's milk during a few weeks.

The present study focuses on the evaluation of the hygienic quality of four samples of the *Bouhezza* cheese manufactured in the goatskin by research of the pathogenic flora: streptococci fecal and *Clostridium sulfitorreductor*. The description of the antimicrobial capacity of seven strains of lactobacilli isolated from *Bouhezza* against different pathogenic flora: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.

The results of this work show the total absence of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium sulfitorreductor* in all the analyzed samples. The study of the antibacterial activity showed an inhibition of *Escherichia coli* by six lactobacilli with zones of inhibition between 15 and 19 mm in diameter. *Staphylococcus aureus* was inhibited only by one lactobacilli with 20 mm. The majority of the strains studied showed a good inhibition of the pathogen *Listeria monocytogenes* with 30 mm.

The lactic acid bacteria ensure a great protection but also a specificity for the traditional Algerian cheese *Bouhezza* thanks to their antimicrobial and acidifying properties making the medium unfavorable for the development of the pathogenic flora lasting its manufacture and its conservation.

Key words: *Bouhezza*, hygienic quality, antimicrobial capacity, lactobacilli.

Résumé

L'objectif de notre travail vise l'étude des aptitudes technologiques de quelques bactéries lactiques isolées du fromage traditionnel Algérien *Bouhezza* et identifiées.

Bouhezza est un fromage de terroir, au lait cru, fabriqué et affiné dans une peau d'animaux "*Chekoua*".

Les résultats de la caractérisation physico-chimiques du fromage ont montré un taux d'extrait sec total (EST en g /100 g de fromage) entre $20,4 \pm 0,28$ et $30,95 \pm 0,60\%$. Les valeurs de pH sont comprises entre $3,79 \pm 0,02$ et $4,32 \pm 0,05$ avec une teneur en acide lactique entre 3,51 et 5,79 gramme pour cent gramme de *Bouhezza*. Les dénombrements microbiens des différentes flores ont montré la prédominance de la flore lactique présentée par les lactobacilles et streptocoques avec des charges de 10^5 à 10^7 UFC/g et 10^5 à 10^8 UFC/g respectivement, suivie par les levures et les moisissures. Les pathogène ; *Clostridium sulfito réducteur* et les streptocoques fécaux sont absentes.

L'isolement et la purification ont concerné 36 souches. Dix-neuf (19) d'entre elles ont fait l'objet d'identification physiologique et biochimique et l'étude du pouvoir technologiques. Les résultats indiquent la dominance du genre *Lactobacillus* (41,10%) suivie par le genre *Leuconostoc* (21,05%), *Pediococcus* (10,52%) et *Enterococcus* (15,78%). Les genres *Lactococcus* et *Bifidobacterium* sont moins important avec 05,26% pour chaque genre.

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques des souches étudiées indiquent un pouvoir acidifiant important pour le genre *Lactobacillus* (jusqu'à 67°D) et *Pediococcus* (65°D), moyen pour *Leuconostoc* (entre 30°D et 44°D) et faible pour *Enterococcus* (25°D). Les souches du genre *Lactobacillus* disposent d'un pouvoir protéolytique important (zone de lyse de 16 à 18 mm) suivi par celles du genre *Pediococcus* (15,5 mm). Les trois autres genres ont une activité protéolytique similaire (autour de 13 mm). Le pouvoir aromatisant, étudié par la production d'acétoïne, est plus remarqué dans les espèces du genre *Lactobacillus* et se diffère d'une espèce à une autre pour les autres genres. L'étude de l'activité antibactérienne par la technique de diffusion en puits a montré l'inhibition de *L. monocytogenes* ATCC, *E. coli* (DH5) et *B. cereus* par les espèces du genre *Lactobacillus* avec des zone d'inhibition entre 15 et 30 mm de diamètre. Une faible inhibition a été remarquée par les espèces des genres ; *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* vis-à-vis de toutes les pathogènes.

Mots clés : fromage *Bouhezza*, bactéries lactiques, acide lactique, protéolyse, arômes, activité antibactérienne.

Abstract

The present study focuses on the study of technological properties of some strains of lactic acid bacteria isolated from the traditional Algerian cheese, *Bouhezza*

Bouhezza is a traditional Algerian cheese known in the east of Algeria (Oum el Bouaghi, Khenchella, Batna, Biskra, etc...). Its exceptional manufacture is based on the use of a goatskin container with Lben salted and raw cow's milk during a few weeks.

The physicochemical analyses of *Bouhezza* showed a dry matter between $20,4 \pm 0,28$ and $30,25 \pm 0,60\%$ per one hundred grams of cheese. The pH is between $3,79 \pm 0,02$ and $4,32 \pm 0,05$ and the acidity is between 3,51 and 5,79 g of lactic acid per one hundred grams of cheese. The microbial enumerations of the various flora showed the prevalence of the lactic flora presented by the lactobacilli and streptococci with loads of 10^5 to 10^7 FCU/g and 10^5 to 10^8 FCU/g respectively followed by yeasts and the moulds. The pathogenic flora is absent.

The insulation and the purification related to thirty six (36) strains. Nineteen (19) of them made object of the physiological and biochemical identification and the study of the technological capacity. The results indicate the predominance of *Lactobacillus* genera (41,10%) followed by *Leuconostoc* (21,05%), *Pediococcus* (10,52%) and *Enterococcus* (15,78%). *Lactococcus* and *Bifidobacterium* are less significant with 05,26% for each one.

The results of the evaluation of technological traits indicate a good acidifying aptitude of *Lactobacillus* genera (until 67°D) and *Pediococcus* (65°D), an average acidifying capacity of *Leuconostoc* (between 30°D and 44°D) and low activity for *Enterococcus* (25°D). The strains of *Lactobacillus* have a significant proteolytic capacity (zone of lysis 16 to 18 mm) follow-up by those of *Pediococcus* genera (15,5 mm) The three other kinds have a similar proteolytic activity (around 13 mm). The aromatizing capacity, studied by the production of acétoïne, is noticed more in all strains of *Lactobacillus* genera and differs in the others genus. The study of the antimicrobial activity by the technique of diffusion out of well showed the inhibition of *L. monocytogenes* ATCC, *E. coli* (DH5) and *B. cereus* with strains of *Lactobacillus* genera. The diameters were between 15 and 30 mm. A less inhibition was obtained with the others genera; *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc*.

Key words: *Bouhezza* cheese, lactic acid bacteria, lactic acid, proteolysis, aroma, antibacterial activity.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الخصائص التكنولوجية لبعض من بكتيريا الحليب المعزولة من الجبن التقليدي بوهزة.

بوهزة هو جبن تقليدي محلي معروف منذ مدة طويلة في منطقة الشاوية يتطلب صنعه استخداما استثنائيا لجلد الماعز أو الغنم المعالج على شكل شكوة للتقطير و النضج. الإضافة المستمرة للبن و الحليب الطازج و الملح يؤدي إلى تشكل الجبن داخل الشكوة.

أظهرت نتائج التحليل الفيزيوكيميائي أن نسبة المستخلص الكلي الجاف للأجبان المجموعة تقدر ما بين $20,4 \pm 0,28$ و $30,95 \pm 0,60$ % غرام من مائة غرام من المادة الجافة. قيمة pH تقدر ما بين: $3,79 \pm 0,02$ و $4,32 \pm 0,05$ مع نسبة من الحموضة تقدر ب: $3,51$ الى $5,79$ غرام من حمض اللين من مائة غرام من جبن بوهزة. أظهرت طريقة تعداد المجموعات البكتيرية الأساسية أن بكتيريا الحليب هي السائدة و المكونة بدورها من المكورات العقدية و العصيات اللبنية بمعدل 10^5 الى 10^7 g/UFC و 10^5 الى 10^8 g/UFC على الترتيب، متبوعة بالخميرة و الفطريات اضافة الى غياب العوامل الممرضة التالية: *Clostridium streptocoques fécaux* و *sulfito réducteur*.

سمحت لنا هذه الدراسة بعزل 36 بكتيريا حليب من الجبن التقليدي بوهزة. التعريف الفيزيولوجي و البيوكيميائي سمح بتصنيف 19 من السلالات المعزولة و دراسة خصائصها التكنولوجية. أظهرت النتائج أعلى نسبة لجنس: *Lactobacillus* (41,05%)، متبوعا بجنس *Leuconostoc* (21,05%)، *Pediococcus* (10,52%) و *Enterococcus* (15,78%). أما جنس *Lactococcus* و *Bifidobacterium* فهما الأقل وجودا بنسبة (05,26%) لكل منهما.

نتائج تقييم الخصائص التكنولوجية للسلالات المعرفة أظهرت قدرة جيدة على انتاج حمض اللين لجنس *Lactobacillus* (ما يصل الى $67D^\circ$) و *Pediococcus* ($65D^\circ$) ، و قدرة متوسطة لجنس *Leuconostoc* (بين 30 و $44D^\circ$) و قدرة منخفضة لجنس *Enterococcus* ($25D^\circ$). السلالات التابعة لجنس *Lactobacillus* يملك قدرة عالية على التحليل البروتيني (من 16 الى 18 ملم) متبوعة بسلالات جنس *Pediococcus* (15,5 ملم)، أما الأجناس المتبقية: *Enterococcus*، *Leuconostoc* و *Lactococcus* فلديها قدرة متشابهة على التحليل البروتيني و المقدرة بحوالي 13 ملم. إن انتاج النكهات (الأسيتوين) كان موجود بأهمية في جميع سلالات جنس *Lactobacillus* و لكنه يختلف من سلالة الى أخرى بالنسبة الى بقية الأجناس. ان دراسة تأثير السلالات المعزولة على البكتيريا الممرضة بواسطة تقنية الانتشار عبر الثقوب أثبتت تثبيط نمو السلالات الممرضة (*DH5*) *E. coli* ، *L. monocytogenes ATCC* و *B. cereus* السلالات المنتمية لجنس *Lactobacillus* بمناطق تثبيط يصل قطرها ما بين 15 و 30ملم. كما تمت ملاحظة تثبيط أقل للسلالات الممرضة عن طريق باقي بكتيريا الحليب المعزولة و التي تنتمي لأجناس *Leuconostoc* و *Lactococcus* ، *Pediococcus* ، *Enterococcus*.

الكلمات المفتاحية : جبن بوهزة، بكتيريا الحليب، حمض اللين، التحلل البروتيني، النكهة، تثبيط البكتيريا الممرضة.