

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N° :

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**Du diplôme de Master Académique**

Par : BOURAS Chahra, TEBANI Khawla, BENCHABENE Karima

**Intitulé**

**Fabrication d'un produit laitier traditionnel  
(Fromage) à partir des ferments lactiques  
isolés et identifiés**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. GUETOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. RAHALI Abdallah	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. ARIECHE Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examinateur

2023 /2024

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, nous remercions, ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de mener à terme le présent travail*

*Nous éprouvons une grande reconnaissance envers notre agréable promoteur **Monsieur Guetouache Mourad** pour ses précieux conseils, sa disponibilité, ses encouragements, nous lui exprimons ici notre respect pour nous avoir fait l'honneur de nous confier la réalisation de ce sujet et nous avoir permis de travailler sous sa responsabilité en nous encourageant et aussi qui nous a guidé et aidé durant la réalisation de ce mémoire qu'elle trouve dans ces mots l'expression de nos vifs remerciements*

*Nos remerciements s'adressent à **madame Naïdji Meriem** pour tous ses efforts et sa patience avec nous à la fin de ce travail à **Monsieur Rehalli Abdallah**, d'avoir accepté de présider ce jury et à **madame Arièche Mounira** d'avoir accepté d'examiner ce travail*

## DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents, Ali et Alafjeia, qui ont grandement contribué à mon arrivée ici. Et à mes frères et sœurs, particulièrement (Fouad, Al-Yamin, Khayredin, Nadhira et Bassema) et à tous mes amis (Maïssa, ines, Rania, Assala, Maha, Aya, Aya, Farah, Rania)*

*Chahra*

اهدي هذا العمل المتواضع لمن كان السبب في وجودي ابي رحمه الله وامي حفظها الرحمن، إلى سندي ومن شجعني على اكمال دراستي زوجي الغالي عبد القاد، إلى زهراتي أخواتي شهيرة وجويده وازواجهم واولادهم، وحببية قلبي اختي الهام وكل عايلتي الكبيرة وجدتي العزيزة الزهرة، وعمتي الوحيدة الذوادية وخالاتي، إلى أروع الصديقات اختايا خولة وشهرة.

كريمة

وَآخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

. الحمد لله عند البدء وعند الختام، فما تناهى درّب، ولا خُتم جهد، ولا تم سعي إلا بفضلله

إلى رمز العطاء والتضحية مثلي الأعلى أبي الغالي (تبانى جمال)، إلى من تستقبلني بإبتسامة وتودعني بالدعاء أُمي الغالية، إلى مستودع العطاء والحب والحنان: إخواني (بلال، عبد الباقي)، أخواتي (عائشة، إكرام، اميمة)، زوج أختي (عياشي عيسى)، إلى بهجة البيت (أنس، إباد، ساجد) وكل العائلة الكريمة

إلى أختي التي لم تلدها أُمي غاليتي رانية جميات

. الحمد لله على البلوغ وعلى التمام

(اللَّهُمَّ أَنْفَعْنِي بِمَا عَلَّمْتَنِي، وَعَلِّمْنِي مَا يَنْفَعُنِي، وَزِدْنِي عِلْمًا)

خولة

# Sommaire

Résumé .....	i
Liste des abréviations .....	ii
Liste des figures .....	iii
Listes des tableaux .....	iv
Introduction .....	1
I. Étude bibliographique .....	2
I.1. Les bactéries lactiques.....	2
I.1.1. Classification.....	3
I.1.2. Métabolites importants des bactéries lactiques .....	4
I.1.3. L'importance des bactéries lactiques dans la fabrication de fromage.....	7
I.2. <i>Lactobacillus</i> .....	8
I.2.1. Les caractéristiques du genre <i>lactobacillus</i> :.....	8
I.2.2. La reconstruction phylogénétique du genre <i>Lactobacilles</i> .....	9
I.3. Le lait et le fromage .....	11
I.3.1. Le lait.....	11
I.3.2. Le fromage .....	14
II. Matériels et méthodes .....	17
II.1. Échantillonnage.....	17
II.2. Isolement et purification des bactéries lactiques.....	17
II.2.1. Préparation des dilutions et ensemencement.....	17
II.2.2. Purification .....	17
II.3. Caractérisation et identification des bactéries lactiques.....	17
II.3.1. Observation macroscopique .....	18
II.3.2. Examen microscopique .....	18
II.3.3. Coloration de GRAM .....	18
II.3.4. Test catalase .....	18

II.3.5.	Test de fermentation.....	18
II.3.6.	Profil fermentaire des sucres .....	19
II.3.7.	Test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes	19
II.3.8.	Conservation des souches.....	19
II.4.	Fabrication de fromage traditionnel .....	20
II.4.1.	Collection du lait .....	20
II.4.2.	La coagulation .....	20
II.4.3.	Séparation du Lactosérum.....	20
II.4.4.	L'égouttage.....	21
II.4.5.	Le salage.....	22
III.	Résultat et discussion .....	24
III.1.	Caractères morphologiques .....	24
III.1.1.	Caractérisation macroscopique.....	24
III.1.2.	Caractérisation microscopique .....	25
III.1.3.	Test catalase.....	26
III.1.4.	Test de fermentation .....	27
III.1.5.	Profile fermentaire des sucres.....	28
III.1.6.	Test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes	28
III.2.	Le fromage .....	29
Conclusion.....		31
Références bibliographiques .....		32
Annexe .....		42

## ملخص

تتمثل الدراسة الحالية في صناعة جبن تقليدي من حليب البقر في ظروف معقمة باستخدام بكتيريا لبنية معزولة ومحددة وبدون أي إضافات كيميائية (المنفحة والأحماض والمخمرات والمواد الحافظة). قمنا بتطبيق اختبارات مختلفة (تلوين غرام، واختبار الكاتلاز، واختبار التخدير، وملف السكر المخمر، واختبار التفاعل بين بكتيريا حمض اللاكتيك والبكتيريا المسببة للأمراض) لدراسة السلالات المعزولة. تحصلنا على 12 سلالة من جنس *Lactobacillus* واخترنا أربع (4) سلالات تملك أفضل الخصائص البيوتكنولوجية.

مرّ حليب الأبقار بعدة مراحل (تحضير الحليب، والترشيح، والتخثر، وتقطيع الخثارة، والتقطيع إلى شرائح وتصفيته وتعليقها)، وأضفنا مستخلصات نباتية لتمييز جودتها الحسية.

وكانت النتيجة جبن ذات مذاق ورائحة وقوام مميز. وراقبنا مدة صلاحيته ولاحظنا أنها طويلة.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا لبنية، جبن تقليدي، حليب البقر، *Lactobacillus*.

## **Abstract**

Our research is based on the artisanal preparation of traditional cow's milk cheese under sterile conditions, using isolated and identified lactic acid bacteria and no chemical additives (rennet, acids, ferments or preservatives). We apply various tests (GRAM staining, catalase test, fermentation test, fermentative sugar profile, interaction test between lactic acid bacteria and pathogenic bacteria) to identify isolated strains. We obtained 12 strains of the *Lactobacillus* genus and selected the four (4) strains with the best physical and chemical characteristics.

Cow's milk went through several stages (milk preparation, filtration, coagulation, curd slicing, draining and salting), and we added plant extracts to differentiate its organoleptic quality. The result is a cheese with a distinctive taste, smell and texture. And we monitored its shelf life and noticed that it was long.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Traditional cheese, *Lactobacillus*, Cow's milk

## Résumé

Notre recherche est basée sur la préparation artisanale du fromage traditionnel de lait de vache dans des conditions stériles à base des bactéries lactiques isolés et identifiés et sans aucun additif chimique (présures, acides, ferments et conservateurs). Nous appliquons des différents tests (coloration de Gram, teste catalase, teste de fermentation, profile fermentaire des sucres, Test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes) pour bien identifier les souches isolées. Nous avons obtenu 12 souches de genre *Lactobacillus* et sélectionné les quatre (4) souches présentant les meilleures caractéristiques physiques et chimiques.

La fabrication du fromage a été effectuée traditionnellement par l'addition des isolats lactiques. le lait de vache est passé par plusieurs étapes (la préparation du lait, la filtration, la coagulation, tranchage du caillé, l'égouttage et le salage), nous avons ajouté des extraits des plantes pour différencier sa qualité organoleptique.

Au final, nous avons obtenu un fromage avec un goût, une odeur et une texture distinctifs. Et nous avons suivi sa durée de conservation et avons remarqué qu'il était long.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, Fromage traditionnel, *Lactobacillus*, Lait de vache.

## Liste des abréviations

**BCAA** : acide aminé à chaîne ramifiée.

**CM** : Cow Milk.

**EPS** : Les exo polysaccharides.

**FF** : Aliments fermentés (fermented food).

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

**GRAS** : généralement reconnu comme sûr.

**GTP** : guanosine triphosphate.

**HePS** : hétéropolysaccharides.

**HoPS** : homopolysaccharides.

**IL** : interleukine.

**LA** : acide lactique.

**LAB** : Les bactéries lactiques (lactic acid bacteria).

## Liste des figures

<b>Figure 4.</b> Formation de coagulum et séparation de lactosérum.....	21
<b>Figure 5.</b> l'égouttage du lactosérum.....	22
<b>Figure 6.</b> Ajout d'extraits de plantes médicinales.....	23
<b>Figure 7.</b> Observation macroscopique des LAB isolées du lait de vache sur gélose MRS solide	24
<b>Figure 8.</b> Observation macroscopique des LAB isolées du lait de vache dans bouillon MRS. ....	25
<b>Figure 9.</b> Observation microscopique des LAB isolées du lait de vache (x100). ....	26
<b>Figure 10.</b> Résultat de types de fermentation. ....	27
<b>Figure 11.</b> Résultat du test de fermentation.....	28
<b>Figure 12.</b> Résultat du profile fermentaire des sucres. ....	28
<b>Figure 13.</b> Résultat de test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes.....	29
<b>Figure 14.</b> Résultat de fabrication de fromage traditionnel.....	30

## Listes des tableaux

<b>Table 1.</b> Bactéries lactiques définies (LAB) et leurs caractéristiques les plus courantes .....	2
<b>Table 2.</b> Familles et genres des bactéries lactiques (LAB) .....	3
<b>Tableau3.</b> Composition moyenne du lait de différentes espèces animales .....	12
<b>Tableau4.</b> Composition du lait en minéraux .....	13
<b>Table 5. Résultat de la coloration de GRAM.</b> .....	25
<b>Tableau 6.</b> Résultat du profile fermentaire des sucres. ....	28

# **Introduction**

## Introduction

Les produits laitiers (Le lait fermenté sont considérés comme l'un des aliments les plus importants et les plus anciens consommés par l'homme. Au-delà de leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques, les bienfaits des produits laitiers fermentés pour la santé sont connus depuis longtemps (Burgos *et al.*, 2020). Les aliments fermentés sont généralement contenus des micro-organismes généralement considérés comme sûrs (GRAS) qui peuvent produire un certain nombre de sous-produits/métabolites bénéfiques tels que les bactériocines, l'éthanol, les acides, acides gras, dioxyde de carbone, et autres (Macori *et al.*,2018).

Les bactéries lactiques (LAB) sont un groupe de bactéries qui comprend des genres tels que *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* et se trouvent fréquemment dans les aliments fermentés laitiers (Pessione *et al.*,2012). Aparté des aliments fermentés laitiers, les bactéries lactiques se trouvent également dans les légumes fermentés, la viande fermentée, et céréales fermentées (Kim *et al.*,2016). L'ingestion de probiotiques harmonise la composition des micro-organismes commensaux de l'environnement intestinal et urogénital en entrant en compétition avec les agents pathogènes pour les nutriments et les sites de liaison et par la production in situ de métabolites antimicrobiens (Zoumpopoulou *et al.* 2017). De plus, les probiotiques contribuent à améliorer la fonction de barrière muqueuse en modulant les réponses immunitaires de l'hôte et en contrôlant les symptômes de l'inflammation gastro-intestinale des conditions comme celles observées dans les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) (Hardy *et al.* 2013). Moins évidente est la contribution que les bactéries lactiques peuvent exercer dans la prévention et le traitement de différentes maladies humaines, notamment gynécologiques, reproductives, métaboliques, cardiovasculaires, ostéoporoses, ainsi que le contrôle de l'apoptose (Rooks *et al.*, 2016).

Dans ce contexte, les objectifs assignés à notre travail consistent à réaliser :

- L'isolement, la purification et l'identification phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un lait cru des vaches.
- La mise en évidence de pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes.
- Fabrication artisanale du fromage à partir de souches isolées et purifiées

# Chapitre I

## Étude bibliographique

## I. Étude bibliographique

### I.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes à Gram positif, catalase négative, qui produisent de l'acide lactique sous forme de produit métabolique majeur de la fermentation des glucides (Mokoena *et al.*, 2021) (tableau 1). Le groupe des bactéries lactiques (LAB) est phylogénétiquement localisé dans la branche *Clostridia* et comprend cocci, coccobacilles ou bâtonnets non sporulés, et anaérobies aérotolestants, dont la composition de base de l'ADN molaire est inférieure à 50% G+C. *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont des espèces communes de LAB associées à la fermentation des aliments. En raison de leur remarquable capacité à entreprendre une fermentation anaérobie et leur bonnes propriétés physiologiques, de survie et probiotiques, certains LAB ont un intérêt particulier pour l'amélioration de la stabilité des matières premières, des valeurs nutritionnelles et des propriétés sensorielles des aliments (Mgomi *et al.*, 2022).

**Table 1.** Bactéries lactiques définies (LAB) et leurs caractéristiques les plus courantes (Castillo *et al.*, 2013).

LAB	Family	Genus	Gram	Growth conditions			Type of Lactic Acid
				Heat-stable (45°C)	Salt-tolerant (18% NaCl)	Acid-resistant (PH 4,4)	
<b>Dairy</b>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	+	Changeable	-	Changeable	D, L, DL
		<i>Pediococcus</i>	+	Changeable	-	+	L, DL
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	+	Changeable	-	-	L
		<i>Lactococcus</i>	+	-	-	Changeable	L
	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	+	-	-	-	
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	+	+	-	+	L
	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	+	-	-	Changeable	D
<b>Nondairy</b>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	+	-	-	-	L
	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	+	-	-	NA	L
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	Changeable	L
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Vagococcus</i>	+	-	-	NA	L
		<i>Fructobacillus</i>	+	NA	-	NA	D
	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Oenococcus</i>	+	-	-	Changeable	D
		<i>Weissella</i>	+	-	-	Changeable	D, L

Bien que les LAB présentent une diversité considérable d'espèces et de souches et qu'elles puissent jouer un rôle important dans différents écosystèmes, les aliments restent leur principale source et leur créneau d'activité préféré. C'est principalement parce que l'activité de fermentation du LAB a été associée aux aliments et étudiée dans les aliments fermentés (FF) depuis début des années 1900 (Cordain *et al.*, 2005).

Certaines souches de LAB sont également considérées comme des probiotiques potentiels, et bon nombre d'entre eux sont commercialisés dans des préparations probiotiques et/ou aliments fonctionnels. De plus, ils sont également membres de l'intestin microbiome des hôtes humains et animaux, bien que leur origine, leur rôle et leurs activités potentielles soient encore largement discutés (Filippis *et al.*, 2020).

Les bactéries lactiques sont parfois classifiées en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30 °C pour les mésophiles, 40 à 45 °C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur phase de croissance. On utilise plutôt les mésophiles pour contribuer à la désamérisations des pâtes fromagères en début d'affinage, alors que les thermophiles sont utilisés pour assouplir les pâtes pressées ou générer des enzymes texturants en pâtes filées (Joubert *et al.*, 2016).

### I.1.1. Classification

Les bactéries lactiques sont à Gram positif appartiennent à l'embranchement *Firmicutes* à faible teneur en G+C ( $\leq 55$  % molaire) dans l'ADN. *Les firmicutes* sont divisés en trois classes : (I) *Bacilles*, (II) *Clostridies* et (III) *Erysipelotrichia* ; Classe I est divisé en deux ordres *Bacillales* et *Lactobacillales*, et LAB appartiennent au second. L'ordonnance (tableau 2) comprend six familles et ~38 genres (Holzapfel, Wood, 2014).

**Table 2.** Familles et genres des bactéries lactiques (LAB) (Schillinger, Endo, 2014).

Lacticacidbacteria	Family I Aerococcaceae
	Abiotrophia, Aerococcus, Facklamia, Dolosicoccus, Eremococcus, Globicatella, Ignavigranum
	<b>Family II Carnobacteriaceae</b>
	Carnobacterium, Marilactibacillus, Trichococcus, Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Bavariococcus, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium

**Family III** Enterococcaceae

Enterococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Catellicoccus, Melissococcus, Pilibacter

**Family IV** Lactobacillaceae

Lactobacillus, Paralactobacillus, Pediococcus

**Family V** Leuconostaccaceae

Fructobacillus, Leuconostoc, Oenococcus, Weissella

**Family VI** Streptococcaceae

Lactococcus, Lactovum, Streptococcus

Les genres hétéro-fermentaires obligatoires sont les *Leuconostocs*, *Oenococci*, *Weissellas*, *Fructobacilliset* un sous-groupe de lactobacilles (groupe III). En revanche, la plupart des autres LAB sont homofermentaire pour les hexoses mais fermente les pentoses comme hétérofermentaires (hétérofermentaires facultatif). Le genre *Lactobacillus* est classé en trois groupes en fonction de la capacité de fermenter les hexoses. Le groupe I comprend l'homo-fermentation obligatoire *Lactobacillus acidophilus*, *L.delbrueckii*, *L.helveticus* et *L.salivarius*. Le groupe II comprend de l'hétéro-fermentaire facultatif *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* et *L. sakei* ; et le groupe III sont les obligés hétéro-fermentaires *L. brevis*, *b. fermentum* et *L. reuteri* (Wright et Axelsson, 2019).

Les LAB produisent à la fois des isomères d'acide lactique (D-, L- ou le mélange racémique). *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* et certaines espèces de *Lactobacillus* forment le D-lactique acide (Obis *et al.*, 2019).

**I.1.2. Métabolites importants des bactéries lactiques**

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (figure 1).

**I.1.2.1. Acides organiques**

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques par fermentation des glucides dans l'intestin, notamment de l'acide lactique (LA) et des acides gras à chaîne courte (AGCC). L'acide aliphatique AL est un acide aliphatique hydrosoluble et hautement hygroscopique. LAB sont divisés en deux clades distincts selon qu'ils utilisent un métabolisme homofermentaire ou

hétérofermentaire. Les bactéries de distillation homofermentaires convertissent une molécule de glucose en deux molécules de LA et deux molécules d'ATP sont générées via l'enzyme aldolase. Les LAB hétérofermentaires utilisent la voie alternée du pentose monophosphate pour convertir les sucres à six atomes de carbone (hexoses) en sucres à cinq atomes de carbone (pentoses), puis produire une molécule d'AL et une molécule d'éthanol ou d'acide acétique via la voie de la phosphocétolase (Juturu *et al.*, 2016). L'AL joue un rôle essentiel dans la fermentation des aliments, la vinification, l'industrie biopharmaceutique et la fabrication de matériaux. Il est également bénéfique pour le traitement clinique en raison de ses propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices (Plummer *et al.*, 2021).

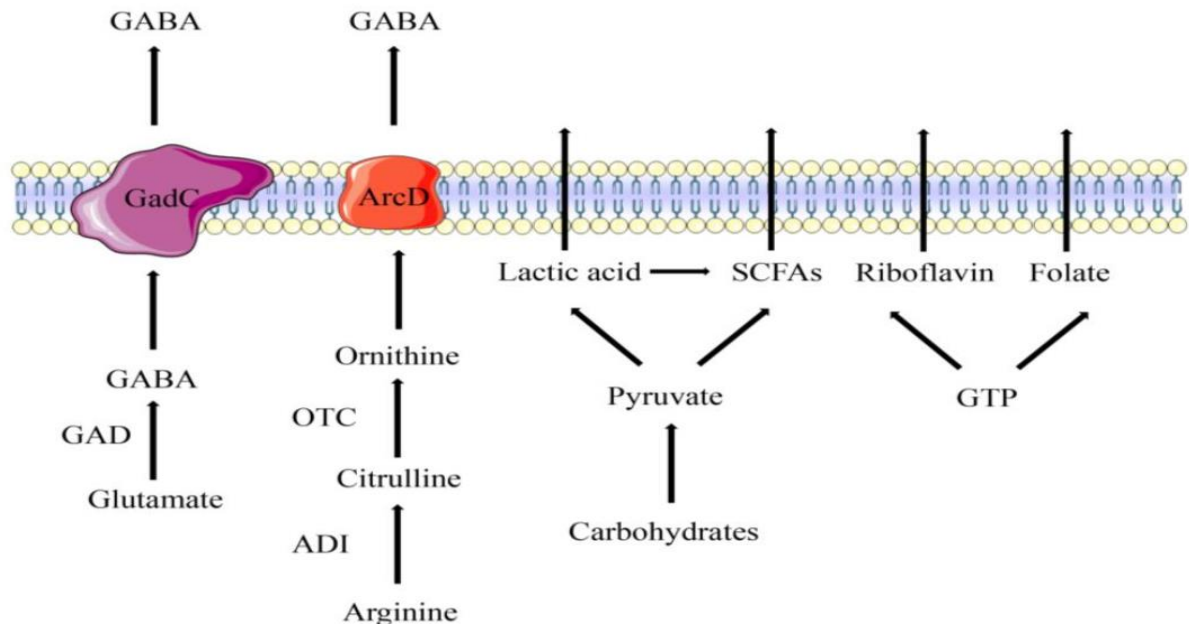
### **I.1.2.2. Acides aminés**

Les bactéries lactiques possèdent quatre voies métaboliques pour les acides aminés (figure 1) : la voie de l'arginine déiminase (ADI), le système glutamate décarboxylase (GAD), la voie des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) et le métabolisme des acides aminés aromatiques (Moore *et al.*, 2022). La voie ADI convertit l'arginine en citrulline et ammoniac, puis la citrulline en ornithine et phosphate de carbamoyl. Les acides aminés de ces voies offrent des avantages pour la santé humaine, comme la citrulline pour traiter l'inflammation intestinale et l'ornithine pour ses fonctions physiologiques (Rakhimuzzaman *et al.*, 2019). Le GABA, un métabolite produit par les LAB, est un neurotransmetteur inhibiteur utilisé pour traiter des troubles psychiatriques. Le GABA est synthétisé par le GAD en conditions anaérobies, puis transporté hors des cellules par l'antiporteur Glu/GABA GadC. Des souches de LAB produisant du GABA ont été isolées de divers aliments fermentés (Kim *et al.*, 2022).

### **I.1.2.3. Vitamines**

Bien que les bactéries lactiques soient considérées comme des bactéries auxotrophes pour plusieurs vitamines, elles sont capables de synthétiser les vitamines du groupe B telles que la riboflavine, le folate, la thiamine et la cobalamine (LeBlanc *et al.*, 2020). La riboflavine est le précurseur de la flavine mononucléotide et de la flavineadénine dinucléotide, ces deux coenzymes aident au métabolisme des glucides, des acides aminés et à la production d'énergie. La riboflavine produite par *L.plantarum* CRL2130 considérablement diminué la libération d'interleukine (IL)-6 et la formation d'oxygène réactif (Perez *et al.*, 2022). Le folate participe à de nombreuses réactions biologiques vitales, notamment la synthèse et la méthylation de l'ADN. Il ne peut pas être synthétisé par l'homme et doit être obtenu de manière exogène (Mosso *et al.*, 2018). La synthèse du folate dans le LAB comprend 17 réactions enzymatiques. Pendant ce

temps, la capacité de la production de folates est spécifique à la souche et est influencée par conditions de croissance (Levit *et al.*, 2021).



**Figure 1.** Synthèse d'acides aminés, d'acides organiques et de vitamines en LAB (Tang *et al.*, 2023).

#### I.1.2.4. Bactériocines

Le groupe des bactériocines est principalement constitué de substances protéiques généralement thermostables avec des propriétés antimicrobiennes. On suppose que l'effet des bactériocines est basé sur la liaison des résidus de phosphate présents sur les membranes cellulaires des cellules cibles, créant des pores et l'activation de l'auto-lysine qui dégrade les parois cellulaires bactériennes. L'un des attributs les plus importants des bactériocines est leur activité contre d'autres bactéries, champignons, virus, parasites et structures naturelles telles que les biofilms (Hernández-González *et al.*, 2021). Leur activité synergique avec d'autres biomolécules telles que l'acide citrique et la nisine contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* est bien connue. Cependant, il est important de noter que les bactéries mentionnées peuvent développer une résistance aux bactériocines, mais elle est minime par rapport à la résistance aux antibiotiques conventionnels (Soltani *et al.*, 2021). Constituent un groupe de substances très attrayantes pour l'industrie alimentaire en raison de leur non-toxicité pour les organismes humains, de leur stabilité thermique, de leur nature protéique et de leur effet antagoniste pour la majorité des micro-organismes à Gram positif (Ayivi *et al.*, 2020).

### **I.1.2.5. Exopolysaccharides**

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polysaccharides à longue chaîne constitué d'unités ramifiées et répétitives de sucres ou de dérivés de sucres synthétisés par des micro-organismes (Werning *et al.*, 2022). En LAB, Les EPS existent généralement à la surface des cellules ou dans la vase et peuvent être sécrétés. Ils sont classés en deux types : les homopolysaccharides (HoPS) et les hétéropolysaccharides (HePS) (Di *et al.*, 2017). Les EPS de LAB présentent des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires et antioxydantes et ont été appliqués dans les industries alimentaires, biomédicales et cosmétiques (Werning *et al.*, 2022).

### **I.1.3. L'importance des bactéries lactiques dans la fabrication de fromage**

Les bactéries lactiques sont des bactéries acidifiantes, aromatiques, historiquement utilisées comme agents de conservation des produits laitiers : acidification en laits fermentés (pH de 4.2 à 4.9), en beurrerie (pH inférieurs ou voisins de 5), en crème de consommation (pH < 5.8) et pour de nombreux fromages (pH démoulage compris entre 4.2 et 5.2).

Elles sont quasi indispensables, par le biais de ces acidifications texturation (yaourts, fromages blancs et crèmes Épaisses) et contribuent fortement au non développement des flores pathogènes (en dessous d'un pH de 5.2). Ces bactéries sont également utiles pour l'aromatisation des produits laitiers, elles produisent, en plus de l'acide lactique, divers composés d'arômes, caractéristiques de la flaveur de nos aliments : acétaldéhyde<sup>2</sup> dans le yaourt, diacétyl<sup>3</sup> dans le beurre, la crème, les fromages gras, accompagné de CO<sub>2</sub>, Utiles pour l'ouverture de certaines pâtes fromagères (pâtes persillées entre autres) (Joubert *et al.*, 2016).

Les bactéries lactiques permettent également d'aromatiser : les bactéries hétérofermentaires produisent divers composés caractéristiques de certains fromages ou produit frais : acétaldéhyde en yaourt, diacétyl en produits gras (fromages, crème Beurre), acétoïne également. L'acide lactique produit est lui-même précurseur d'arômes, lorsqu'il est re-métabolisé en acide propionique, butyrique, alcools et autres par les ferments d'affinage. Enfin, les bactéries lactiques aromatiques sont également productrices de CO<sub>2</sub>, qui contribuer à l'ouverture des fromages. Par l'acidification, les bactéries lactiques limitent l'installation et le développement des flores indésirables, voire pathogènes. Certaines souches sont aujourd'hui spécifiquement utilisées pour lutter contre des contaminants particuliers, comme les *Listéria*, les butyriques ou d'autres contaminants de surface (Joubert *et al.*, 2016).

## ***1.2. Lactobacillus***

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont parmi les plus Taxons importants impliqués dans la microbiologie alimentaire et humaine Nutrition : plusieurs espèces de *Lactobacillus* sont remarquablement essentiels dans la production d'aliments fermentés et sont utilisés comme cultures de démarrage ou conservateurs alimentaires. Par ailleurs, certains Des souches d'origine humaine sont exploitées comme probiotiques Ou des porte-vaccins (YJ *et al.*, 2009).

### **1.2.1. Les caractéristiques du genre *lactobacillus* :**

Les membres du genre *Lactobacillus* ne sont pas sporulés, Catalase négative (même si certaines souches sont capables de produire Pseudocatalase), bâtonnets saccharolytiques obligatoires ou coccobacilles, Généralement caractérisé par une faible teneur en GC (guanine et cytosine) du génome bien que la limite supérieure en GC Atteigne 59,2% en moles. On considère généralement qu'ils ont un métabolisme fermentaire, bien que Des preuves moléculaires récentes remettent en question cette définition. Outre l'acide lactique, les autres produits secondaires sont l'acétate, Ethanol, CO<sub>2</sub>, formiate et succinate (Brooijmans *et al.*, 2009).

Les lactobacilles sont généralement aérotolérants ou anaérobies, Acidurique ou acidophile. En général, ils ne synthétisent pas Porphyroïdes et sont dépourvus d'activités hème-dépendantes. La température de croissance varie de 2 à 53 « C, et Ils sont capables de croître dans une plage de pH comprise entre 3 et 8. La température et le pH optimaux de croissance sont généralement de 30 à 40 « C Et 5,5 à 6,2, respectivement.

Ils ont des besoins nutritionnels complexes en termes de Acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras ou gras Esters acides, et on les trouve dans des habitats riches où des substrats contenant des glucides sont disponibles, comme la nourriture (produits laitiers, produits céréaliers, produits de viande et de poisson, Bière, vin, fruits et jus de fruits, légumes marinés, purée, Choucroute, ensilage et levain), eau, terre et eaux usées ; Ils font partie de la flore normale de la bouche, du tractus gastro-intestinal et Voies génitales des humains et de nombreux animaux (Hammes *et al.*,2009).

La taxonomie des lactobacilles est basée depuis des années. Sur les propriétés phénotypiques comme la fermentation des glucides Modèles, résistance à différentes concentrations de Na Cl, Croissance dans différents milieux à température ou pH défini et résistance aux antibiotiques, élargie à Inclure la composition de la paroi cellulaire, les acides gras cellulaires, Quinones isoprénoides et autres caractéristiques du Cellules (klein *et al.*,1998).

---

## **I.2.2. La reconstruction phylogénétique du genre *Lactobacilles***

### **I.2.2.1. Groupe *Lactobacillus delbrueckii***

Le groupe *Lactobacillus delbrueckii* est composé de 27 espèces, 5 d'entre eux, *L. equicursoris*, *L. gigeriorum*, *L. hominis*, *L. pasteurii* et *L. taiwanensis*, Taxonomiquement, c'est le Groupe phylogénétique le plus important en raison de la présence de *L. delbrueckii*, espèce type du genre, dont le nom *Lactobacillus* y est lié en permanence. Il contient principalement Les homofermenteurs obligatoires (20 sur 27), mais aussi certains Hétérofermenteur facultatifs (6 espèces) et un seul Hétérofermenteur obligatoire (Felis *et al.*, 2007).

### **I.2.2.2. Groupe *Lactobacillus salivarius***

Le groupe *Lactobacillus salivarius* comprend 25 espèces, dont 11 Ils ont été décrits ces dernières années (*L. Aquaticus*, *L. cacaonum*, *L. capillatus*, *L. ceti*, *L. ghanensis*, *L. hayakitensis*, *L. hordei*, *L. oeni*, *L. pobuzihi*, *L. sucicola* et *L. uvarum*). Semblable au groupe *L. delbrueckii*, il Contient principalement des homofermenteurs (16 espèces sur 25) et également Hétérofermenteur facultatifs (9 espèces) (Salvetti *et al.*, 2012).

### **I.2.2.3. Groupe *Lactobacillus reuteri***

Le groupe *Lactobacillus reuteri* est composé de 15 espèces, et Il est conforme à la description précédente avec le A l'exception de l'ajout de deux espèces, *L. alvi* et *L. equigenerosi*. Il se caractérise principalement par Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, à l'exception de *L. coleohominis* et *L. secaliphilus*, qui sont des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (Salvetti *et al* 2012).

### **I.2.2.4. Groupe *Lactobacillus buchneri***

Le groupe *Lactobacillus buchneri* est composé de 12 espèces, 4 espèces ont été ajoutées au cours des 5 dernières années (*L. kisonensis*, *L. otakiensis*, *L. rapi* et *L. sunkii*). De la même manière Au groupe *L. reuteri*, il contient principalement des hétérofermentaires obligatoires, ainsi que des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (Salvetti *et al.*, 2012).

### **I.2.2.5. Groupe *Lactobacillus alimentarius***

Le groupe *Lactobacillus alimentarius* comprend 11 espèces, 4 espèces ont été récemment décrites (*L. crustorum*, *L. futsaii*, *L. kimchiensis* et *L. nodensis*). Il contient Obligatoirement des membres homofermentaires et hétérofermentaires facultatifs (Salvetti *et al.*, 2012).

**I.2.2.6. Groupe *Lactobacillus brevis***

Le groupe *Lactobacillus brevis* est constitué de 10 espèces. Ce groupe ne comprenait que 3 Espèces. D'après l'analyse phylogénétique réalisée Dans la présente étude, 4 espèces (*L. acidifarinae*, *L. namurensis*, *L. spicheri* et *L. zymae*) ont été transférées de Groupe *L. buchneri*, tandis que trois autres espèces ont récemment été Décrits (*L. koreensis*, *L. paucivorans* et *L. senmaizukei*). Il contient à la fois des éléments facultatifs et Espèces hétérofermentaires obligatoires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.7. Groupe *Lactobacillus collinoïdes***

Le groupe *Lactobacillus collinoïdes*, formé de 5 espèces, a été Défini dans la présente étude grâce à la description de *L. kimchicus*, *L. odoratitofui* et *L. similis*. C'est Les membres sont hétérofermentaires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.8. Groupe *Lactobacillus fructivorans***

Le groupe *Lactobacillus fructivorans* est composé de 5 espèces, Il Contient principalement des hétérofermentaires obligatoires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.9. Groupe *Lactobacillus plantarum***

Le groupe *Lactobacillus plantarum* comprend 5 espèces, de Dont 2 espèces, *L. fabifermentans* et *L. xiangfangensis*, Ont été décrits respectivement en 2009 et 2011. Ce groupe est très homogène en termes de métabolisme Caractéristiques, puisque les membres sont hétérofermentaires facultatifs (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.10. Groupe *Lactobacillus sakéi***

Le groupe *Lactobacillus sakei* comprend 4 espèces, Tous Les espèces sont hétérofermentaires facultatives (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.11. Groupe *Lactobacillus casei***

Le groupe *Lactobacillus casei* comprend 3 espèces Ce groupe est homogène puisque ses membres Sont hétérofermentaires facultatifs (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.12. Groupe *Lactobacillus coryniformis***

Le groupe *Lactobacillus coryniformis* est composé de 3 membres (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.13. Groupe *Lactobacillus manihotivorans***

Le groupe *Lactobacillus manihotivorans* a été défini pour Première fois dans la présente étude grâce à la description de *L. nasuensis* et *L. porcinae*. Ils sont Homofermentaires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.14. Groupe *Lactobacillus perolens***

Le groupe *Lactobacillus perolens* est composé de *L. harbinensis*, *L. perolens* et de la nouvelle espèce *L. shenzhenensis*. *L. harbinensis* et *L. perolens* sont facultatifs Hétérofermentaires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.15. Groupe *Lactobacillus vaccinoferus***

Le groupe *Lactobacillus vaccinoferus* est établi selon l'analyse phylogénétique actuelle, et il est composé Par 3 espèces. Tous sont hétérofermentaires obligatoires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.2.2.16. Espèces hors groupes**

Quant aux espèces hors groupes, elles constituent 4 couples et 10 lignes de descendance simples. L'association la plus stable est celle composée de *L. rossiae* et *L. siliginis* : toutes deux hétérofermentaires obligatoires (Salvetti *et al.*,2012).

**I.3. Le lait et le fromage****I.3.1. Le lait**

Le lait de mammifère est un liquide biologique complexe produit par les glandes mammaires. C'est le premier aliment naturel pour les mammifères, fournissant toute l'énergie et les nutriments nécessaires à une croissance et à un développement correct dans la période postnatale. Le lait est une source potentielle de divers macro et micronutriments (Kim et Yi, 2020). En effet, le lait contient des composants bioactifs potentiels, ce qui aide au maintien du bon métabolisme et du bon fonctionnement du corps humain. Contrairement à d'autres mammifères, la consommation de lait par l'homme ne s'arrête pas à la fin de la période de sevrage mais se poursuit à l'âge adulte. La production commerciale mondiale de lait de vache (CM : Cow Milk) est nettement supérieure à celle de autres espèces animales, atteignant environ 83 % de la consommation mondiale (Bittante *et al.*, 2022).

La production nationale de lait a atteint 3,52 milliards de litre en 2017 dont plus de 2,58 milliards de litre de lait de vache (73%), le coût de production de la filière lait a atteint 179,71 milliards de

dinars en 2017, à ce propos, le ministre a fait état de 971.633 têtes de vaches laitières, 17.709.588 brebis, 2.949.646 chèvres laitières et 207.884 chamelles (Tamni, 2018).

### I.3.1.1. Composition du lait de vache

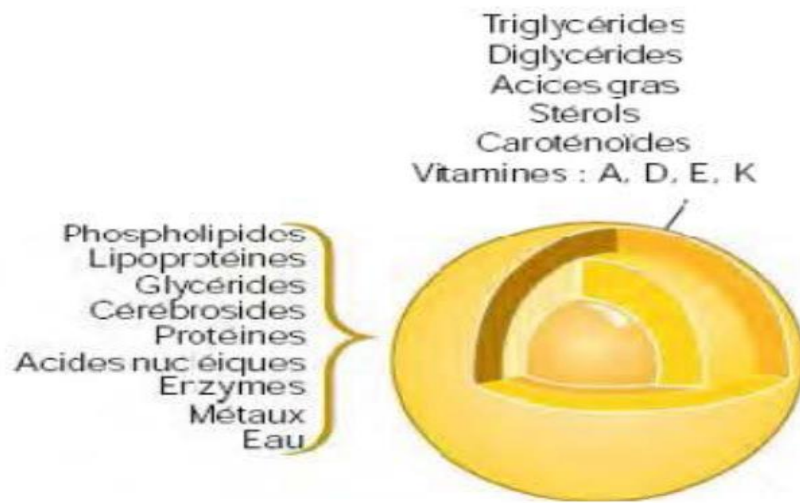
Le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E (Carole, 2010) (tableau 3).

**Tableau3.** Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (Carole, 2010).

Animaux	Eau (%)	Matière grasse (%)	Protéine (%)	Glucides (%)	Minéraux (%)
Vache	87,5	3,7	3,2	4,6	0,8
Chèvre	87,0	3,8	2,9	4,4	0,9
Chamelle	87,6	5,4	3,0	3,3	0,7

L'eau est le principal composant du lait. Son caractère polaire, dû à la présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres, lui permet de dissoudre des substances polaires comme les glucides et les minéraux, et de former une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Les matières grasses, étant non polaires, forment une émulsion de type huile dans l'eau. De même, les micelles de caséines, solides, forment une suspension colloïdale (Amiot *et al.*, 2002).

Les matières grasses du lait sont de petits globules sphériques, invisibles à l'œil nu, mesurant de 0,1 à 20  $\mu\text{m}$ . Leur taille varie selon l'espèce, la race, et la période de lactation. En moyenne, ils ont un diamètre de 3 à 4  $\mu\text{m}$ , avec environ trois à quatre milliards de globules par millilitre de lait entier (figure 2) (Carole, 2010).



**Figure 2.** Structure d'un globule de matière grasse du lait (Amiot *et al.*, 2002)

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers. L'analyse du lait par minéralisation, appelée méthode Kjeldahl, permet d'évaluer que 95% de la quantité totale d'azote est présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3,2%. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée (Carole, 2010).

Le lactose est le constituant majeur de la matière sèche du lait, en particulier le lait de femme, où il représente plus de la moitié de l'extrait sec totale. Le lactose résiduel est transformé en acide lactique par les enzymes microbiennes du colon (Jeantet *et al.*, 2006).

La quantité des minéraux contenus dans le lait après incinération varie de 0,60 à 0,90% (tableau 4). Ils prennent plusieurs formes ; ce sont plus souvent des sels, des bases, des acides (Carole, 2010).

**Tableau 4.** Composition du lait en minéraux (Carole, 2010).

Minéraux	Teneur (mg/kg)
<b>Sodium (Na)</b>	445

<b>Magnésium (Mg)</b>	105
<b>Phosphore</b>	896
<b>Chlore (Cl)</b>	958
<b>Potassium (K)</b>	1500
<b>Calcium (Ca)</b>	1180
<b>Fer (Fe)</b>	0,50
<b>Cuivre (Cu)</b>	0,10
<b>Zinc (Zn)</b>	3,80
<b>Iode (I)</b>	0,28

Les enzymes, substances organiques protidiques, catalysent les réactions biochimiques et sont produites par des cellules vivantes. Environ 60 enzymes principales sont présentes dans le lait, dont 20 sont natives. Beaucoup se trouvent dans la membrane des globules gras, mais la présence de leucocytes et de bactéries dans le lait, produisant également des enzymes, rend difficile la distinction entre enzymes natives et extérieures (Pougheon 2001).

### **I.3.2. Le fromage**

La production de fromage existe depuis environ 8 000 ans. Et il existe aujourd'hui plus de 1 000 variétés dans le monde, chacune ayant un goût, une texture et une forme uniques (Nam *et al.*, 2021).

#### **I.3.2.1. Définition**

Selon le Codex Alimentarius, le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi dure, dure ou extra dure obtenu après coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème, crème de lactosérum ou babeurre, seuls ou en combinaison. On obtient le fromage par coagulation complète ou partielle du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette (Codex Alimentarius, 2006).

### **I.3.2.2. Les compositions du fromage**

Le fromage est généralement un produit laitier fermenté riche en nutriments et bien toléré, consommé dans le monde entier. Le fromage est une source riche en protéines de haute qualité (principalement la caséine), de lipides, de minéraux (par exemple le calcium, le phosphore et le magnésium), de vitamines (par exemple la vitamine A, la vitamine K2, la vitamine B2, la vitamine B12 et les folates), de probiotiques et de molécules bioactives (par exemple le calcium, le phosphore et le magnésium), ainsi que des probiotiques et des molécules bioactives (ex : Peptides bioactifs, lactoferrine, acides gras à chaîne courte et membrane des globules gras du lait), qui peuvent avoir divers effets bénéfiques sur la santé(Nam *et al.*,2021).

### **I.3.2.3. Les ingrédients du fromage**

La plupart des fromages sont fabriqués à partir de quatre ingrédients : le lait, la présure, les micro-organismes (généralement des cultures de départ de bactéries lactiques) et le sel. La fabrication du fromage comporte six étapes essentielles : acidification, coagulation, séparation du lactosérum, salage, mise en forme et affinage (Beresford *et al.*,2001).

### **I.3.2.4. Procédés de fabrication du fromage**

La fabrication fromagère est l'agglomération des éléments protéiques du lait, principalement de la caséine qui emprisonnent les autres constituants et ensuite, de l'agglomération de morceaux de caillé moulés. Un écoulement de la phase liquide associé à l'agglomération, composée de l'eau du lait et des éléments solubles emprisonnée dans des pores puis libérée. La fabrication comprend trois étapes : la coagulation du lait (formation d'un gel de caséines), l'égouttage (déshydratation partielle du gel) qui aboutit à un caillé et enfin le salage. Ces étapes concernent les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés (Beresford *et al.*,2001).

### **I.3.2.5. Les propriétés microbiennes du fromage**

Il est important de comprendre les propriétés microbiennes du fromage, car les différents micro-organismes peuvent jouer un rôle essentiel dans le développement des propriétés organoleptiques, la composition des nutriments et la sécurité du fromage (Jonnala *et al.*,2018).

Le microbiote contribue de manière significative à la qualité, à la sécurité et à d'autres propriétés physicochimiques des fromages. Il a également un impact sur chaque étape de la transformation du fromage, de la pasteurisation du lait cru à l'affinage. La compréhension de sa contribution est un facteur crucial dans le développement des caractéristiques souhaitables et de la qualité du

produit final (Nam *et al.*,2021). Les fromages au lait cru ont une saveur plus intense que les fromages au lait pasteurisé, ce qui les rend populaires auprès des consommateurs (Masoud *et al.*,2012). La communauté microbienne endogène du lait cru influence le développement de la saveur des fromages au lait cru. Le microbiote naturel contribue également à inhiber la croissance des bactéries pathogènes d'origine alimentaire, par exemple, les LAB sont les principaux micro-organismes du fromage au lait cru, qui produisent des substances telles que des bactériocines, des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène qui inhibent la croissance des agents pathogènes et préservent les qualités organoleptiques du fromage inhibent la croissance des pathogènes et maintiennent des populations microbiennes souhaitables (Yoon *et al.*,2016).

#### **I.3.2.6. Les types de fromages**

La grande variété de types de fromages est classée en sept catégories, à savoir :

- 1) Les fromages à pâte dure (teneur en eau inférieure à 43 %).
- 2) Semi-dur (teneur en eau de 44 à 55 %).
- 3) Fromage à pâte molle (teneur en eau supérieure à 56 %), qui comprend les pâtes molles, les pâtes filées et le lactosérum.
- 4) Les fromages en saumure blanche.
- 5) Moisissures affinées en surface.
- 6) Affinés en surface par des bactéries.
- 7) Fromages bleus (Bintsis 2021).

# Chapitre II

## Matériels et méthodes

## **II. Matériels et méthodes**

### **II.1. Échantillonnage**

Les échantillons de lait des vaches proviennent de la région de M'sila (Maadidà M'sila). Les vaches doivent être non vaccinées et ne pas consommer d'anti biotiques, et les conditions de stérilisation doivent également être respectées lors de la traite des vaches.

### **II.2. Isolement et purification des bactéries lactiques**

On faire l'isolement et les tests microbiologiques dans le laboratoire pédagogique à la faculté de microbiologie à l'université de M'sila.

#### **II.2.1. Préparation des dilutions et ensemencement**

Nous effectuons une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) en utilisant de l'eau physiologique à raison de 9 ml par tube. Ensuite, nous ajoutons 1 ml de l'échantillon mère dans le premier tube ( $10^{-1}$ ). Ensuite, nous préparons une série de dilutions à partir de l'homogénat ( $10^{-1}$ ) jusqu'à atteindre une dilution ( $10^{-6}$ ).

Les dilutions ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) ont été utilisées pour effectuer l'ensemencement en profondeur dans le milieu de culture MRS. Couler le milieu gélosé MRS. Homogénéiser parfaitement le contenu, en effectuant des mouvements circulaires en forme de chiffre 8. Le milieu de culture doit se solidifier, puis les boîtes doivent être incubées à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C}$  pendant une période de 24 à 72 heures.

#### **II.2.2. Purification**

Après le passage des bactéries lactiques dans le milieu MRS solide, on faire le repiquage. A l'aide de l'anse de platine on prendre une colonie bactérienne jeune et bien isolée et on le met dans des tubes contiennent le milieu MRS liquide, et les incuber à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h. Après l'apparition des troubles bactériennes dans les tubes, et à l'aide d'une anse de platine, une quantité de la culture du bouillon a été prélevé et ensemencé par la technique des stries pour l'obtention des isolats purs sur des boites contenant du MRS solide et les incuber à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h.

Ensuite on faire le repiquage des colonies bactériennes à partir des colonies ensemencées par la technique des stries pour la deuxième fois, après 48 h d'incubation a  $37^{\circ}\text{C}$ , les tubes sont maintenus a  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant une période de 2 semaines a un mois.

### **II.3. Caractérisation et identification des bactéries lactiques**

Les isolats lactiques ont été identifiés en utilisant divers tests morphologiques et physiologiques.

### II.3.1. Observation macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle des troubles sur milieu de culture (MRS Liquide), et permet de déterminer l'aspect des colonies comme la couleur, la forme, l'aspect et la taille des colonies (MRS solide).

### II.3.2. Examen microscopique

La coloration de Gram est utilisée pour évaluer la préparation microscopique et classer les bactéries en fonction de leur Gram, de leur morphologie et de leur mode d'association. (Leveau *et al.*, 1991).

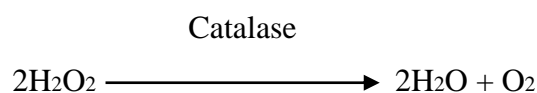
### II.3.3. Coloration de GRAM

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° pendant 10 seconds, puis rincer à l'eau distillé.
- Faire une contre coloration en utilisant la Fuschine et laisser agir 60 secondes.
- Laver à l'eau distillé.
- 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.

### II.3.4. Test catalase

L'objectif de ce test est d'identifier les bactéries lactiques (catalase -) et les entérobactéries (catalase +). Le peroxyde d'hydrogène se décompose en oxygène et en eau grâce à l'activité catalytique. On peut le prouver en émulsifiant une émulsion dans deux colonies d'isolat de souche pour le test dans une solution fraîche de peroxyde d'hydrogène à 10 %. La formation de mousse gazeuse est le signe de la décomposition du peroxyde d'hydrogène sous l'action de l'enzyme à tester. Quoi qu'il en soit, la libération de gaz est le résultat de l'activité positive de l'enzyme catalase qui hydrolyse l'hydrogène peroxyde (Guetouache 2021).



### II.3.5. Test de fermentation

Ce test permet d'évaluer le type de métabolisme utilisé pour la transformation du substrat carboné. Il implique également de souligner la production de gaz (CO<sub>2</sub>). La procédure consiste à

incuber la souche dans un milieu liquide MRS contenant la cloche de Durham, ce qui permet de détecter le gaz produit. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham est un signe de développement d'une bactérie hétérofermentaire, ce qui n'est pas le cas chez les bactéries homofermentaires (Guétouache *et al.*, 2014).

### **II.3.6. Profil fermentaire des sucres**

Ce test permet d'évaluer la capacité des souches à obtenir des sucres en fermentation. Afin d'y parvenir, nous utilisons le milieu MRS BCP. Ainsi, les cultures bactériennes l'ont ensemencé en grande quantité. Une fois la culture incubée pendant 24 heures, le développement de la culture et le changement de couleur de l'indicateur indiquent la fermentation du sucre testé. Pour chaque milieu utilisé, on utilise un témoin sans sucre ensemencé par les souches (Badis *et al.*, 2005). Ce test a été réalisé sur 4 sucres selon les étapes suivantes :

- On récupère le culot après centrifugation 3000 t/ min pendant 15 minutes des milieux de cultures jeunes et on ajoute 1 ml d'eau Physiologie après le rinçage de culot.
- Dans des tubes, On met 0,2g de différents sucres (Mannitol, Maltose, xylose, saccharose).
- Dans la microplaque on ensemence 0.1ml de MRS BCP ,0.1ml des solutions de différents sucres et 0.1 ml des souches puis on y ajoute une goutte D'huile de paraffine stérile pour l'anaérobiose.
- L'incubation se fait à 30 °C pendant 24 h.

### **II.3.7. Test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes**

La méthode de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971) a été appliquée. 20 ml de milieu MH solide sont coulés dans des boîtes de Pétri. Sur cette couche, on ensemence par 100 µL d'une culture fraîche de la bactérie lactique, Après solidification, de petits cylindres (moules en acier inoxydable) d'un diamètre de 6 mm vont nous permettre de confectionner des puits. 100 µl de surnageant sont déposés au niveau de chaque puits. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 h. La présence d'une zone claire autour des colonies, indiquant l'absence de croissance d'évidence du pouvoir antibactérien des LAB par la technique de diffusion en puits de TAGG et Mc Given (1971).

### **II.3.8. Conservation des souches**

Les souches pures obtenues sont conservées Pour une longue durée :

- Les souches sont centrifugées à 3000 tours/ min pendant 10min après le surnageant est éliminée et on fait le rinçage du culot puis on les ajoute 2ml d'eau Physiologie.
- Le milieu de conservation contient 70% de lait écrémé (7 ml) et 30% du glycérol (3ml).

- Dans les tubes Eppendorf on met : 0.5 ml de milieu de conservation et 0.5 ml extrait culot+ l'eau physiologie et stockés à une température de -20 °C.

## **II.4. Fabrication de fromage traditionnel**

La transformation du lait en fromage a permis de conserver des éléments nutritifs du lait sur des périodes plus ou moins longues (Gelais et Tirard,2009). Le processus fromage début avec la préparation du lait, les deux étapes principales de l'élaboration d'un fromage sont la coagulation et l'égouttage suivi accessoirement de l'affinage après salage.

Afin de faire du fromage, nous avons suivi les étapes suivantes :

### **II.4.1. Collection du lait**

Nous avons collecté du lait dans les fermes (Maadid à M'sila) en tenant compte des conditions de stérilisation lors de l'échantillonnage. Le lait est conservé au frais dans une glacière et en respectant les normes d'hygiène. Nous filtrons puis pasteurisons le lait sur une période d'au moins deux heures, puis nous en avons séparé la crème et l'avons laissé refroidir.

### **II.4.2. La coagulation**

Cette étape consiste à solidifier le lait par acidification des ferments utilisé. Le lait passe alors de l'état liquide à l'état solide (Daoud *et al.*, 2021). Après avoir fait la centrifugation des souches bactériennes, les avoir lavées et leur avoir ajouté 1 ml d'eau physiologique, nous avons ajouté au lait (à température ambiante) une quantité spécifique des bactéries lactiques à la fois (3 ml, 4 ml, 5 ml), puis nous l'avons incubé pendant 12 à 24 heures à une température de 37°C.

### **II.4.3. Séparation du Lactosérum**

Après avoir déposé le coagulum qu'est une agrégation des micelles de caséine du lait et l'avoir séparé du lacto-sérum obtenu par coagulation du lait (figure 4). Elle crée un caillé doux, gélatineux et extrêmement résistant (Daoud *et al.*, 2021), après 24 h de la mise en coagulation le caillé est tranché en plusieurs morceaux à l'aide d'un couteau, et l'enlèvement de caillé est réalisé à l'aide d'une louche perforé pour assurer l'élimination de lactosérum.



**Figure 1.** Formation de coagulum et séparation de lactosérum.

#### **II.4.4. L'égouttage**

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (PH, AW) et chimiques du caillé et par conséquent l'affinage du fromage. Il s'accompagne à l'échelle microscopique d'une élimination significative du lactosérum (figure 5) et d'une rétraction et d'un durcissement du gel : il donne lieu à une masse de caillé dont l'extrait sec est au moins concentré et qui correspond au fromage formé (Daoud *et al.*, 2021).



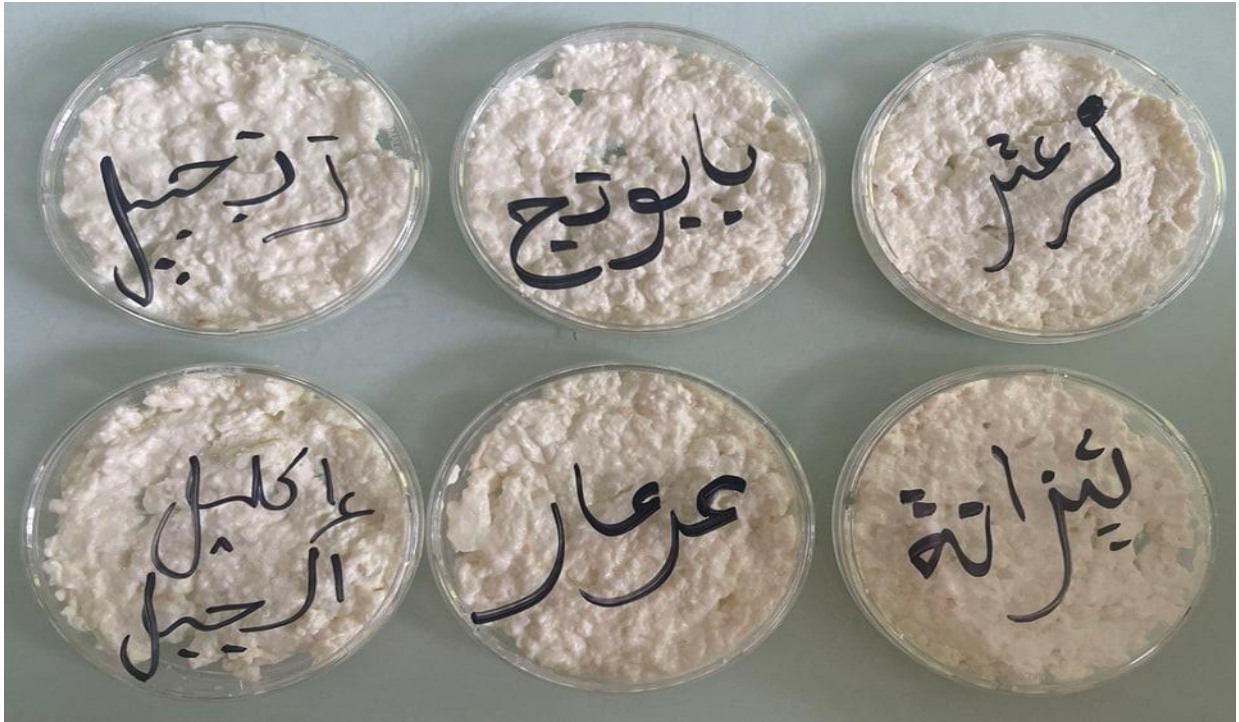
**Figure 2.** l'égouttage du lactosérum.

#### **II.4.5. Le salage**

Le processus de salage joue un rôle crucial dans la production du fromage, car le fromage non salé est presque insipide. Le sel est aussi un élément essentiel de la texture, de la saveur et de la qualité microbienne des fromages. Il empêche la prolifération de certaines bactéries, qui sont néfastes pour le fromage et qui provoquent sa dégradation, notamment sur sa surface. Il contrôle l'activité de l'eau du fromage, ce qui guide et entrave les croissances microbiennes et les actions enzymatiques pendant l'affinage (Daoud *et al.*, 2021).

Après avoir séparé le fromage, nous le mettons en solution salin (20%) pendant 2 heures, à cette étape on peut ajouter des extraits des plantes médicinales (romarin, thym, gingembre...) (figure 6) qui donnent des différents goûts au fromage et augmentent ses bienfaits, tout en conservant fromage traditionnel sec.

Puis nous le filtrons à nouveau et le séchons pendant 4 heures, puis nous le coupons et l'emballons.



**Figure 3.** Ajout d'extraits de plantes médicinales.

# Chapitre III

## RESULTAT ET DISCUSSION

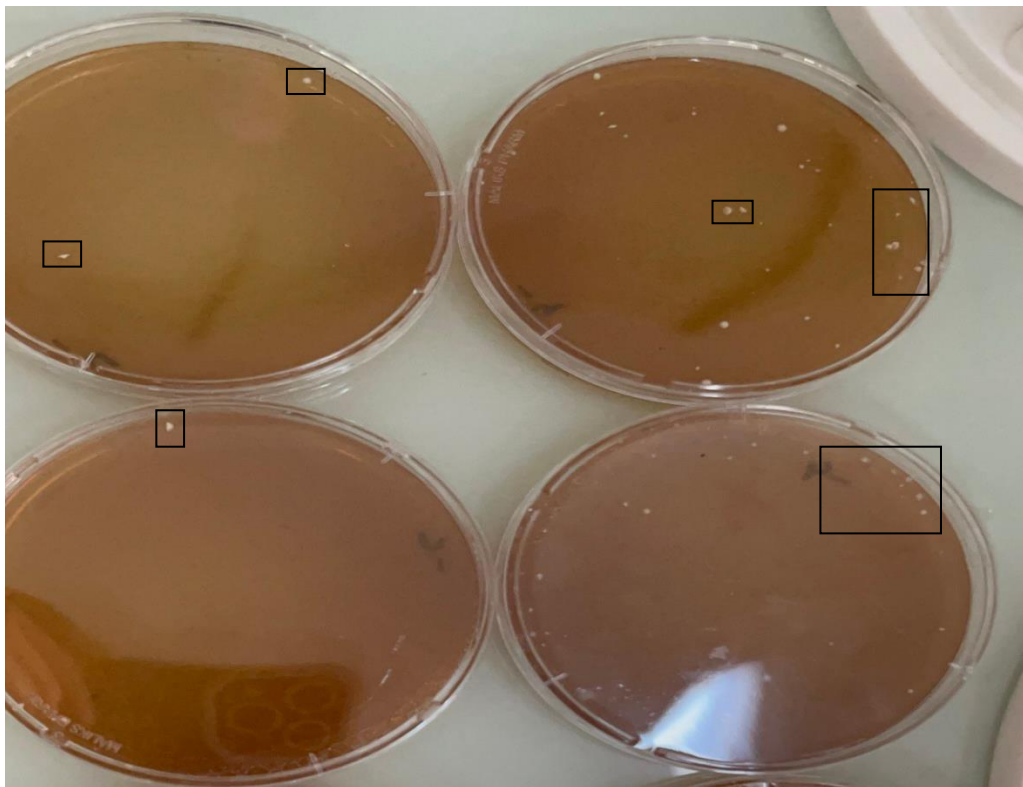
### III. Résultat et discussion

#### III.1. Caractères morphologiques

##### III.1.1. Caractérisation macroscopique

###### III.1.1.1. Milieu solide

Après avoir incubé les colonies sur un milieu solide MRS à pH = 6,5, nous avons observé des petites colonies solides moyennes d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme ronde et de couleur blanche, extrêmement bien isolées (figure 7).



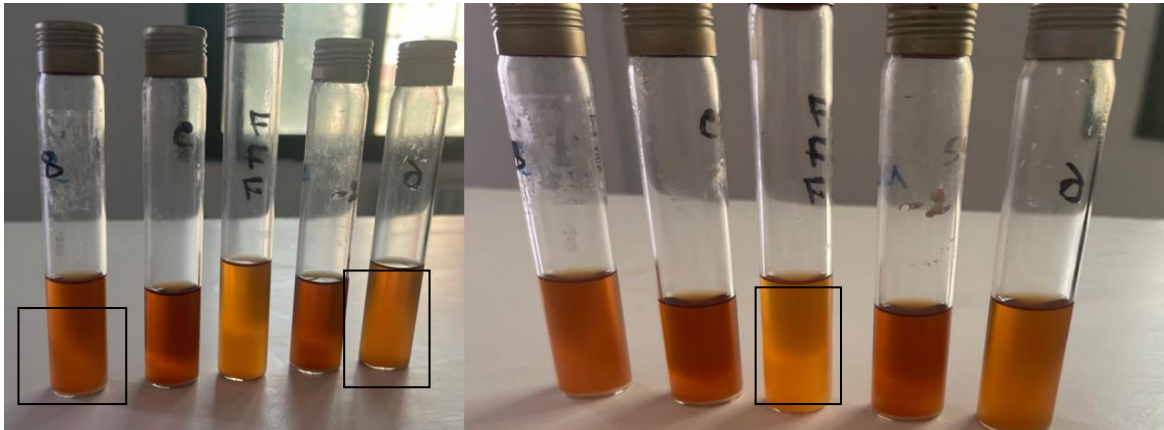
**Figure 4.** Observation macroscopique des LAB isolées du lait de vache sur gélose MRS solide

- Les colonies obtenues sur un milieu solide MRS à pH = 5,6 après incubation peuvent être caractérisées par l'aspect macroscopique, ce qui permet de les comparer aux normes des colonies de bactéries lactiques. De petites colonies solides moyennes d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme ronde et de couleur blanche ont été identifiées (Cherifi et *al.*2019).

###### III.1.1.2. Milieu liquide

A l'œil nu, nous avons pu constater la turbidité au fond du tube et son absence dans le tube témoin (figure 8).

- L'observation macroscopique nous a permis d'observer un trouble assez dense par rapport au témoin, ce qui suggère une croissance bactérienne au fond du tube (Cherifi *et al.*2019).



**Figure 5.** Observation macroscopique des LAB isolées du lait de vache dans bouillon MRS.

### III.1.2. Caractérisation microscopique

L'observation au microscope après la coloration de GRAM indique que les souches sont en forme de bacilles, Gram positive (+), bien visibles, a déférente mode d'association (tableau 5) (figure 9).

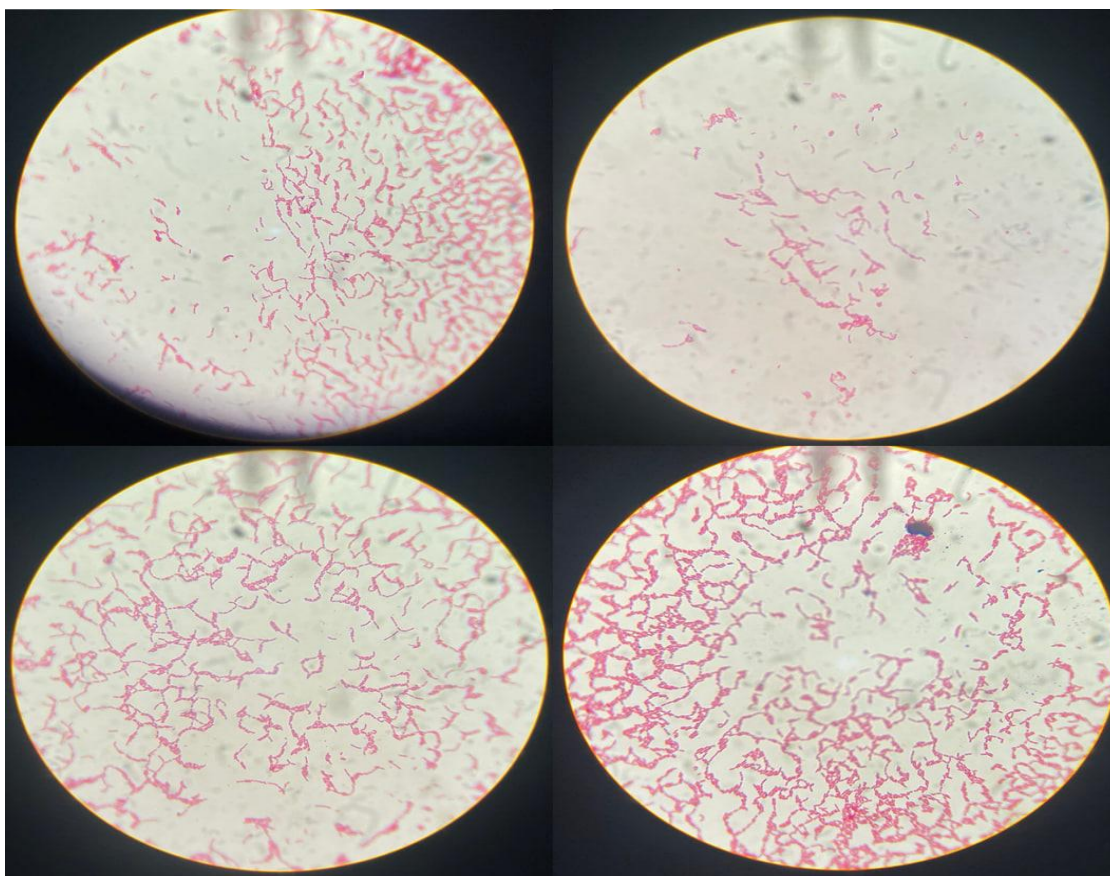
Après coloration de Gram, l'observation au microscope révèle que ces bacilles Gram (+) sont clairement visibles (Ayachi *et al.*, 2022).

**Table 5. Résultat de la coloration de GRAM.**

Les souches	GRAM	La forme	Mode d'association
1	+	Bacilles	En deux
2	+	Bacilles	En chaînette courtes et en deux
3	+	Bacilles	En chaînette
4	+	Bâtonnet	En chaînette courtes et longues
5	+	Bacilles	En deux
6	+	Bacilles	En chaînette courtes et en deux
7	+	Bacilles	En chaînette courtes et longues et en deux
8	+	Bacilles	En deux
9	+	Bâtonnet	En chaînette courtes et longues
10	+	Bacilles	En chaînette courtes et en deux

11	+	Bacilles	En amas et en deux
12	+	Bacilles	En deux

**Figure 6.** Observation microscopique des LAB isolées du lait de vache (x100).



**Figure 1.** Observation microscopique des LAB isolées du lait de vache (x100).

### III.1.3. Test catalase

On recherche la catalase en mettant les colonies en contact avec quelques gouttes d'eau oxygénée. Lorsqu'il n'y a pas aucun dégagement de gaz, le résultat est négatif.

- On a examiné les activités des enzymes catalase et oxydase. Selon les résultats, les souches de *Lactobacillus* présentent une catalase négative (Ayachi *et al.*, 2022).

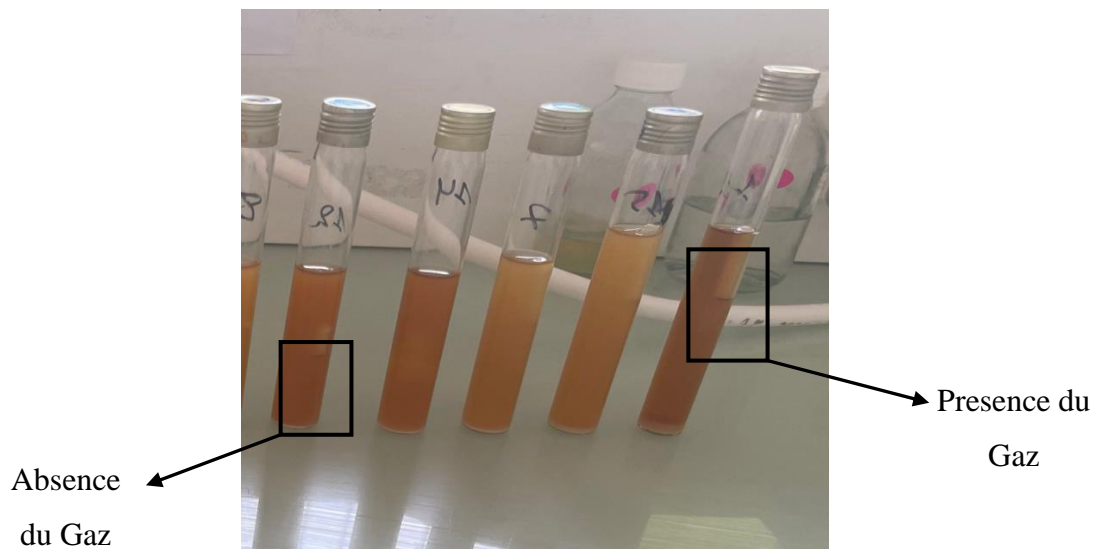
Selon les études ; les lactobacilles se caractérisent par des bacilles ou des coccobacilles à Gram positif, non sporulés et catalases négatives, ils sont strictement fermentaires (Otieno *et al.*, 2011).

### III.1.4. Test de fermentation

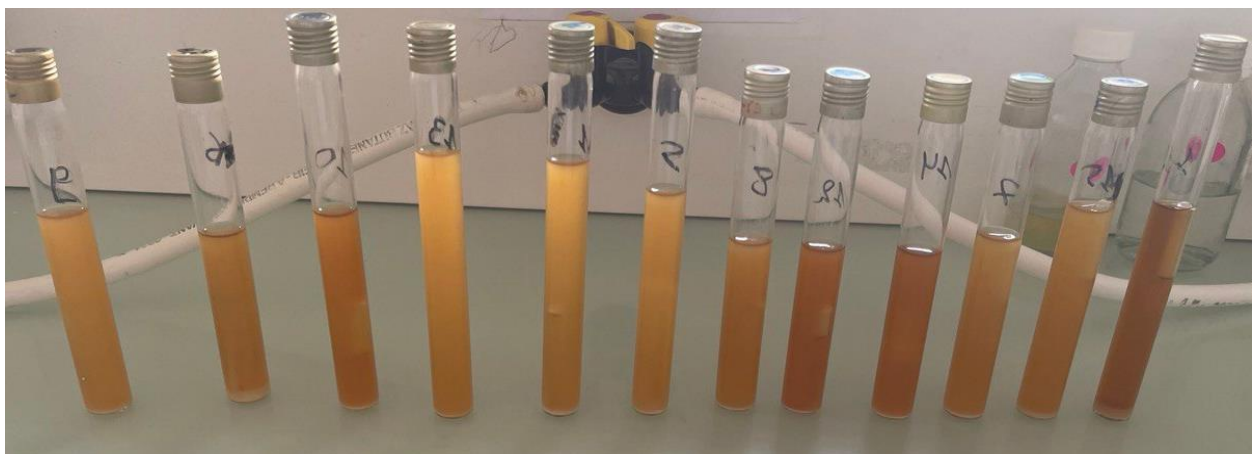
Les tubes dans lesquels la bulle de gaz est apparue dans la cloche du dirham (figure 10) indique que les souches (7, 11, 15) (figure 11) sont hétérofermentaires, alors-que les souches (1, 5, 6, 8, 9, 10, 12,14) (figure 11) sont homofermentaires à cause de l'absence de bulle de gaz dans la cloche de dirham.

➤ Grâce à ce test, trois isolats hétérofermentaires ont été choisis. Cependant, le groupe homofermentaire occupe une position dominante dans les cultures de nos bactéries lactiques (Benstaali, 2022).

Avec le glucose comme source de carbone, les lactobacilles peuvent être homofermentaires et produire plus de 85 % d'acide lactique, ou hétérofermentaires et produire de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et/ou de l'acide acétique en quantités équimolaires (Hammes *et al.*, 1995).



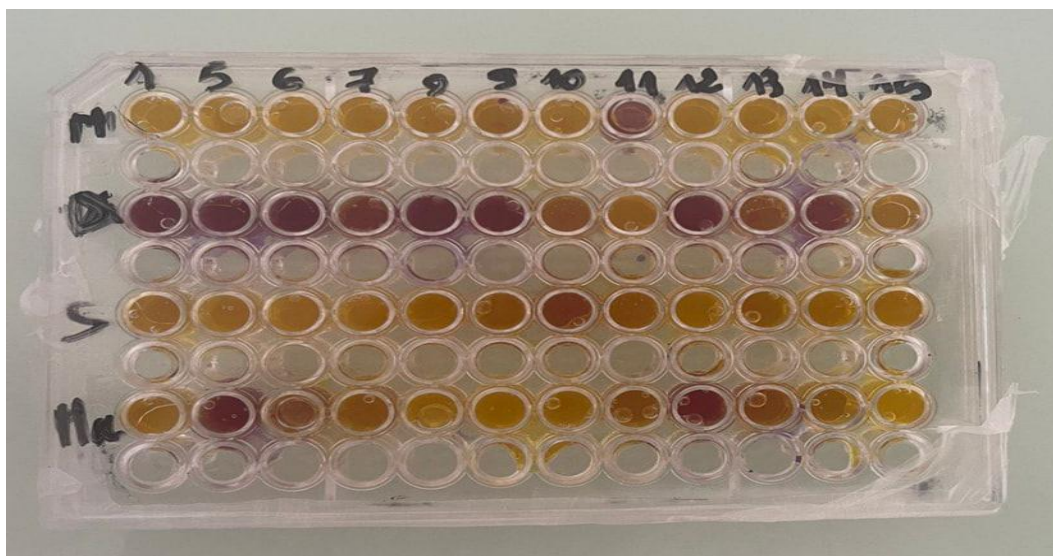
**Figure 7.** Résultat de types de fermentation.



**Figure 8.** Résultat du test de fermentation.

### III.1.5. Profil fermentaire des sucres

Ce teste se traduit par un changement de couleur dans la microplaque après 24 h. On trouve des souches qui fermentent des sucres, et des souches qui ferment d'autres sucres (figure 12) (tableau 6).



**Figure 9.** Résultat du profil fermentaire des sucres.

**Tableau 6.** Résultat du profil fermentaire des sucres.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mannitol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
<b>Xylose</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+/-	-	+
<b>Saccharose</b>	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
<b>Maltose</b>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

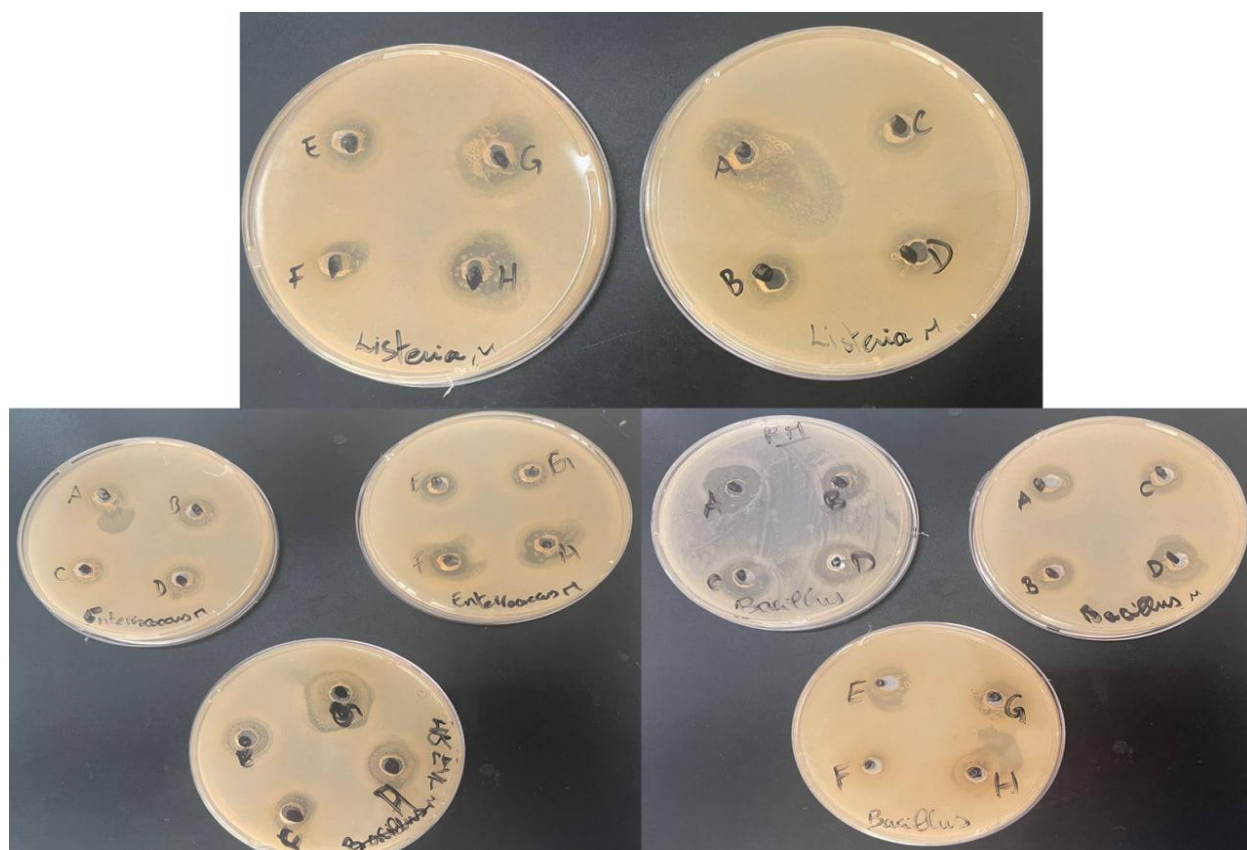
+ : Réaction positive    - : Réaction négative    +/- : Réaction intermédiaire

### III.1.6. Test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes

Ce test nous permet de confirmer l'étendue de l'effet des bactériocines produites par *Lactobacillus* contre les bactéries pathogènes qui affectent négativement la qualité du fromage. Les pathogènes utilisés sont : *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*.

On observe l'apparition de zones d'inhibition de diamètre moyen à large autour des bactéries pathogènes utilisées, indiquant l'effet significatif de la bactériocine produit par notre souche contre ces bactéries (figure 13).

Selon (Márcia *et al.*,2022) les études ont montré que l'utilisation des bactéries lactiques comme cultures de départ dans la fermentation alimentaire permet de préserver les aliments en produisant rapidement des acides. En plus de diminuer le pH, certaines espèces/souches de LAB ont des caractéristiques antibactériennes qui découlent d'une combinaison de facteurs, tels que la croissance compétitive et la production d'une diversité de composés antibactériens, et (Soltani *et al.*, 2021) montre que l'activité synergique des LAB avec d'autres biomolécules telles que l'acide citrique et la nisine contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* est bien connue.



**Figure 10.** Résultat de test d'interaction entre les bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes

### III.2. Le fromage

Après la coagulation du lait nous obtenons un caillé bien formé avec des pores et il est complètement séparé du lactosérum. Au final, après avoir effectué le processus de l'égouttage et

de salage, nous obtenons un fromage frais qui se distingue par son odeur et son goût, et qui a également une longue durée de conservation par rapport aux fromages traditionnels ordinaires (figure 14).



**Figure 11.** Résultat de fabrication de fromage traditionnel

# **CONCLUSION**

## **Conclusion**

Cette étude vise la mise en évidence de l'effet de ces bactéries lactiques isolés et identifier et la détermination des taux appropriés, pouvant servir à la fabrication des Fromages de qualité dans différents tests suivant : Caractérisation microscopique (bacilles, Gram positive (+), bien visibles, à différents modes d'association), Profil fermentaire des sucres (on trouve que la plupart des souches ferment les types des sucres utilisés). Teste catalase (catalase négatif), teste de fermentation (Homofermentaire, hétérofermentaire).

Après l'addition des isolats dans le lait de la vache bien pasteurisé, Le lait de vache est passé par plusieurs étapes (la préparation du lait, la filtration, la coagulation, tranchage du caillé, l'égouttage et le salage), les résultats obtenus montrent que, ces fromages sont de bon goût et de couleur blanchâtre.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

Albano C, Silveti T, Brasca M (2020). Screening of lactic acid bacteria producing folate and their potential use as adjunct cultures for cheese bio-enrichment. *FEMS Microbiol Lett*367(9): fnaa059.

Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R et Turgeon H, (2002), composition, propriétés physicochimique, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait in VIGNOLA C. L, science et technologie du lait-Transformation du lait, Ecole polytechnique de Montréal, ISBN, 600 p.

Ayachi Ali, Benziane Oussama, Benlaiter Ahmed, 2022, Isolement et identification des nouvelles souches lactiques productrices de bactériocines à partir d'un produit laitier traditionnel (Leben) à la région de M'sila, Mémoire master.

Ayivi, R.D.; Gyawali, R.; Krastanov, A.; Aljaloud, S.O.; Worku, M.; Tahergorabi, R.; da Silva, R.C.; Ibrahim, S.A. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* 2020, *1*, 202–232.

Azaïs-Braesco, V.; Bresson, J.L.; Guarner, F.; Corthier, G. Not all lactic acid bacteria are probiotics, . . . but some are. *Br. J. Nutr.* 2010, *103*, 1079–1081.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., &Ouzrout, R. (2005). Caracterisation Benstaali Noria, 2022, Isolement et identification des bactéries lactiques autochtones isolés de lait de vache de la région d'Oued Rhiou.

Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM (2001) Recent Advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11(4–7) :259–274

Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM (2001) Recent Advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11(4–7) :259–274.

Bintsis T. Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiol.* 2021 Nov 8 ;7(4) :447-470. Doi : 10.3934/microbiol.2021027. PMID: 35071942; PMCID: PMC8712537.

Bintsis T. Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiol.* 2021 Nov 8 ;7(4) :447-470. Doi : 10.3934/microbiol.2021027. PMID: 35071942; PMCID: PMC8712537.

Brooijmans RJW, de Vos WM, Hugenholtz J (2009) The electron transport chains of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl Environ Microbiol* 75:3580–3585. doi:10.1128/AEM.00147-09

Brooijmans RJW, de Vos WM, Hugenholtz J (2009) The electron transport chains of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl Environ Microbiol* 75:3580–3585.

Campana, R.; van Hemert, S.; Baffone, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.* 2017,9,12.

Carole L et Vignola F, (2010). Science technologie du lait- Transformation de lait, Fondation de technologie Laitière du Québec, pp.3-26, 34-35.

Carole L et Vignola F, (2010). Science technologie du lait- Transformation de lait, Fondation de technologie Laitière du Québec, pp.3-26, 34-35.

Castillo Martinez, F.A.; Balciunas, E.M.; Salgado, J.M.; Domínguez González, J.M.; Converti, A.; de Souza Oliveira, R.P. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2013, 30, 70–83.

Cécile CHARLES.2016. REVUE DES ENIL N° 345 - 12-2016.

Cécile CHARLES.2016. REVUE DES ENIL N° 345 - 12-2016.

CHERIFI Sabrina et CHETIOUI Yamina;2019; Etude de l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* isolées à partir du Lben traditionnel provenant de la commune de Ben Srour (M'Sila) à l'égard des quelques souches pathogènes ciblées; memoir master.

Codex Alimentarius, 2006. Codex General Standard for Cheese : CODEX STAN A-6-1978. 26th Session FAO/WHO Food Standards Programme.

Codex Alimentarius, 2006. Codex General Standard for Cheese : CODEX STAN A-6-1978. 26th Session FAO/WHO Food Standards Programme.

Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(15), 2276.

Cordain L, Eaton SB, Sebastian A *et al.* Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*2005; 81:341–54.

Daoud A, Bembakhouch A, Bakhouch I, Benteboula M, (2021). Fabrication de fromage traditionnel à base du lait de vache avec l'incorporation de quelques épices.

Davoren, M.J.; Liu, J.; Castellanos, J.; Rodríguez-Malavé, N.I.; Schiestl, R.H. A novel probiotic, *lactobacillus johnsonii*456, resists acid and can persist in the human gut beyond the initial ingestion period. *Gut Microbes* 2019, 10, 458–480.

- De Filippis, F., Pasoli, E., & Ercolini, D. (2020). The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS microbiology reviews*, 44(4), 454–489.
- Di W, Zhang L, Wang S, Yi H, Han X, Fan R, Zhang Y (2017). Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. *CarbohydrPolym*171: 307-315.
- Didier JOUBERT.REVUE DES ENIL N° 345 – 12-2016.
- Didier Joubter. Revue des enil N° 345 – 12-2016.
- Ershidat, O.T.M.; Mazahreh, A.S. Probiotics bacteria in fermented dairy products. *Pakistan J. Nutr.* 2009, 8, 1107–1113.
- Fan X, Yu L, Shi Z, Li C, Zeng X, Wu Z, Pan D (2022). Characterization of a novel flavored yogurt enriched in gammaaminobutyric acid fermented by *Levilactobacillus brevis* CGMCC1.5954. *J Dairy Sci* S0022-0302(22)00715-9.
- Franciosi E, Carafa I, Nardin T, Schiavon S, Poznanski E, Cavazza A, Larcher R, Tuohy KM (2015). Biodiversity and gamma-aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BiomedRes Int* 2015: 625740.
- Fredot E, (2006). *Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*, Tec et Doc, Lavoisier, 25 :397 p.
- García-Burgos, M.; Moreno-Fernández, J.; Alférez, M.J.M.; Díaz-Castro, J.; López-Aliaga, I. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J. Funct. Foods*2020, 72, 104059.
- Gelais et Tirard Collet ST. (2009). *Fromage : Science et technologie du lait transformation du lait*. ED/ISBN. Canada. P 345.
- Ghosh, T.; Beniwal, A.; Semwal, A.; Navani, N.K. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 502.
- Goh YJ, Klaenhammer TR (2009) Genomic features of *Lactobacillus* species. *Front Biosci* 14 :1362–1386. Doi :10.2741/3313.
- Goh YJ, Klaenhammer TR (2009) Genomic features of *Lactobacillus* species. *Front Biosci* 14 :1362–1386.

Guetouache M, Faid A, Mebarki M (2021). Characterization and Identification of Lactobacilli from Raw Goat's Milk Came from the Rural Area of the Province of Djelfa in Algeria, IAR Journal of Clinical & Medical Biochemistry.

Guetouache M., Bettache, G. & Omrane, T. (2014). Sanitary quality and ecology of the lactic bacteria isolated from traditional butter. International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences, 2(9), 97-104. SSN (E): 2321-8851.

Hammes WP, Hertel C (2009) Genus I. Lactobacillus Beijerinck, 1901. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W,

Hammes WP, Hertel C (2009) Genus I. Lactobacillus Beijerinck, 1901. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 465–510.

Hammes, W.P.; Vogel, R.F. The genus lactobacillus. In The Genera of Lactic Acid Bacteria; Springer: New York, NY, USA, 1995; pp. 19–54

Hardy, H.; Harris, J.; Lyon, E.; Beal, J.; Foey, A. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 2013, 5, 1869–1912.

Hernández-González, J.C.; Martínez-Tapia, A.; Lazcano-Hernández, G.; García-Pérez, B.E.; Castrejón-Jiménez, N.S. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals* 2021, 11, 979.

Jeanet R., Croguennec., Schuck P et Brule G, (2006). Science des aliments. Vol 2, *Technologies des produits alimentaires, Tec & Doc, Lavoisier*, Paris, p. 456

Juturu V, Wu JC (2016). Microbial production of lactic acid: the latest development. *Crit Rev Biotechnol* 36(6): 967-977.

Kim J, Lee MH, Kim MS, Kim GH, Yoon SS (2022). Probiotic Properties and Optimization of Gamma-aminobutyric Acid Production by *Lactiplantibacillus plantarum* FBT215. *J Microbiol Biotechnol* 32(6): 1-10.

Kim J, Lee MH, Kim MS, Kim GH, Yoon SS (2022). Probiotic Properties and Optimization of Gamma-Aminobutyric Acid Production by *Lactiplantibacillus plantarum* FBT215. *J Microbiol Biotechnol* 32(6): 783-791.

Kim J, Yoon YW, Kim MS, Lee MH, Kim GA, Bae K, Yoon SS (2022). Gamma-aminobutyric acid fermentation in MRS-based medium by the fructophilic *Lactiplantibacillus plantarum* Y7. *Food Sci Biotechnol* 31(3): 333-341.

Kim, H.-Y.; Bong, Y.-J.; Jeong, J.-K.; Lee, S.; Kim, B.-Y.; Park, K.-Y. Heterofermentative lactic acid bacteria dominate in Korean commercial kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* 2016, 25, 541–545.

Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G (1998) Taxonomy and Physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41 :103–125. Doi :10.1016/S0168-1605(98)00049-X.

Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G (1998) Taxonomy and Physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41 :103–125. Doi :10.1016/S0168-1605(98)00049-X.

LeBlanc JG, Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A (2020). Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(8) : 3331-3337.

Leveau, J.Y., Boiux, M., De roissart, H.B. 1991. La flore lactique dans : *technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. 2<sup>ed.</sup>, Tec&Doc, Lavoisier. Paris, p 3.

Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG (2021). Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. *J Appl Microbiol* 130(5): 1412-1424.

Li Y, Xiao L, Tian J, Wang X, Zhang X, Fang Y, Li W (2022). Structural Characterization, Rheological Properties and Protection of Oxidative Damage of an Exopolysaccharide from *Leuconostoc citreum* 1.2461 Fermented in Soybean Whey. *Foods* 11(15): 2283.

Luo H, Liu Z, Xie F, Bilal M, Liu L, Yang R, Wang Z (2021). Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 41(4): 491-512.

Macori, G.; Cotter, P.D. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018, 49, 172–178.

Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Jakobsen M (2012) The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and Quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153(1–2) :192–202

Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Jakobsen M (2012) The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and

*Staphylococcus aureus* In Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and Quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153(1–2):192–202.

Meybodi, N.M.; Mortazavian, A.M.; Arab, M.; Nematollahi, A. Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *Int. Dairy J.* 2020, *109*, 104793.

Mgomi FC, Yuan L, Wang Y, Rao SQ, Yang ZQ. Physiological properties, survivability and genomic characteristics of *Pediococcus pentosaceus* for application as a starter culture. *Int J Dairy Technol* 2022; 0:1–15.

Milk and Milk Products. *Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission*, 2nd ed.; Food & Agriculture Organization: Rome, Italy, 2011.

Mokoena MP (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22(8): 12555.

Mokoena MP, Omatola CA, Olaniran AO. Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules* 2021;26(22).

Moore JF, DuVivier R, Johanningsmeier SD (2022). Changes in the free amino acid profile of pickling cucumber during lactic acid fermentation. *J Food Sci* 87(2): 599-611.

Mosso AL, Jimenez ME, Vignolo G, LeBlanc JG, Samman NC (2018). Increasing the folate content of tuber based foods using potentially probiotic lactic acid bacteria. *Food Res Int* 109: 168-174.

Mulaw, G.; Sisay Tessema, T.; Muleta, D.; Tesfaye, A. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. *Int. J. Microbiol.* 2019, 7179514.

Nam JH, Cho YS, Rackerby B, Goddik L, Park SH. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Mar;105(6):2307-2318. Doi: 10.1007/s00253-021-11201-5. Epub 2021 Mar 4. PMID: 33661344.

Nam JH, Cho YS, Rackerby B, Goddik L, Park SH. Shifts of microbiota during cheese production: impact on production and quality. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Mar;105(6):2307-2318. Doi: 10.1007/s00253-021-11201-5. Epub 2021 Mar 4. PMID: 33661344.

Obis, D., Paris, M., & Ouwehand, A. C. (2019). The safety of lactic acid bacteria for use in foods. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (5th ed., pp. 355–370). CRC Press.

Oh, S. Probiotics in Dairy Products. In *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*; Liong, M.-T., Ed.; Microbiology Monographs; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; Volume 27, pp. 203–219. ISBN 978-3-319-23176-1.

Otieno, D.O. Biology of prokaryotic probiotics. In *Probiotics*; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 1–28.

Perez Visnuk D, Teran MDM, Savoy de Giori G, LeBlanc JG, de Moreno de LeBlanc A (2022). Neuroprotective Effect of Riboflavin Producing Lactic Acid Bacteria in Parkinsonian Models. *Neurochem Res* 47(5): 1269-1279.

Pérez-Ramos, A. ; Madi-Moussa, D. ; Coucheney, F.; Drider, D. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms* 2021, 9, 2107.

Pessione, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012, 2, 86.

Pessione, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity:Lights and shadows. *Front. Microbiol.* 2012, 2, 86.

Phenotypique Des Bacteries Lactiques Isolees A Partir De Lait Cru De ChevreDedeux Populations Caprines Locales" Arabia Et Kabyle". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, (23), 30-37.

Plummer EL, Bradshaw CS, Doyle M, Fairley CK, Murray GL, Bateson D, Masson L, Slifirski J, Tachedjian G, Vodstrcil LA (2021). Lactic acid-containing products for bacterial vaginosis and their impact on the vaginal microbiota: A systematic review. *PLoS One* 16(2): e0246953.

Pougheon S etGoursaud G, (2001). Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., *Lait, nutrition et santé*, Tec et Doc, Paris, 6: 566 p.

Qi H, Li Y, Yun H, Zhang T, Huang Y, Zhou J, Yan H, Wei J, Liu Y, Zhang Z, Gao Y, Che Y, Su X, Zhu D, Zhang Y, Zhong J, Yang R (2019). *Lactobacillus* maintains healthy gut mucosa by producing L-Ornithine. *Commun Biol* 2: 171.

Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 465–510

- Rakhimuzzaman M, Noda M, Danshiitsoodol N, Sugiyama M (2019). Development of a System of High Ornithine and Citrulline Production by a Plant-Derived Lactic Acid Bacterium, *Weissellaconfusa* K-28. *Biol Pharm Bull* 42(9): 1581-1589.
- Reuben, R.C.; Roy, P.C.; Sarkar, S.L.; Alam, A.S.M.R.U.; Jahid, I.K.; RubayetUl Alam, A.S.M.; Jahid, I.K. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J. Dairy Sci.* 2020, *103*, 1223–1237.
- Rooks, M.G.; Garrett, W.S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2016, *16*, 341–352.
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus* : a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4, 217-226.
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4, 217-226.
- Schillinger, U., & Endo, A. (2014). Minor genera of the Carnobacteriaceae: *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Bavariicoccus*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum* and *Lacticigenium*. In W. H. Holzapfel, & B. J. B. Wood (Eds.), *Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy* (pp. 159–170). Wiley Blackwell.
- Soltani, S.; Hammami, R.; Cotter, P.D.; Rebuffat, S.; Said, L.B.; Gaudreau, H.; Bedard, F.; Biron, E.; Drider, D.; Fliss, I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol. Rev.* 2021, *45*, fuaa039.
- Soltani, S.; Hammami, R.; Cotter, P.D.; Rebuffat, S.; Said, L.B.; Gaudreau, H.; Bedard, F.; Biron, E.; Drider, D.; Fliss, I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol. Rev.* 2021, *45*, fuaa039.
- Spacova I, Ahannach S, Breynaert A, Erreygers I, Wittouck S, Bron PA, Van Beeck W, Eilers T, Alloul A, Blansaer N, Vlaeminck SE, Hermans N, Lebeer S (2022). Spontaneous Riboflavin-Overproducing *Limosilactobacillusreuteri* for Biofortification of Fermented Foods. *Front Nutr*9: 916607.
- Tammi A, (2018). Production national de lait.
- Tang, H., Huang, W., & Yao, Y. F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial cell (Graz, Austria)*, *10*(3), 49–62.
- Tang, H., Huang, W., & Yao, Y. F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial cell (Graz, Austria)*, *10*(3), 49–62.

- Terpou, A.; Papadaki, A.; Bosnea, L.; Kanellaki, M.; Kopsahelis, N. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. *LWT* 2019, *105*, 242–249.
- Vignola C, (2002). Science et technologie du lait, chapitre 06 : le fromage : transformation de lait. Ecole polytechnique de Montréal.
- von Wright, A., & Axelsson, L. (2019). Lactic acid bacteria: An introduction. In G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (5th ed., pp. 1–16). CRC Press
- Werning ML, Hernandez-Alcantara AM, Ruiz MJ, Soto LP, Duenas MT, Lopez P, Frizzo LS (2022). Biological Functions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals. *Foods* 11(9): 1284.
- Xu W, Cao F, Zhao M, Fu X, Yin S, Sun Y, Valencak TG, Ren D (2022). Macrophage activation by exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* fermented milk through TLRs-mediated NF-kappaB and MAPK pathways. *Int Immunopharmacol* 108: 108875.
- Yeluri Jonnala BR, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD (2018) Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Front Microbiol* 9 :1020
- Yeluri Jonnala BR, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD (2018) Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Front Microbiol* 9 :1020.
- Yoon Y, Lee S, Choi KH (2016) Microbial benefits and risks of raw milk Cheese. *Food Control* 63 :201–215
- Yoon Y, Lee S, Choi KH (2016) Microbial benefits and risks of raw milk Cheese. *Food Control* 63 :201–215.
- Zhang J, Yang Y, Yang H, Bu Y, Yi H, Zhang L, Han X, Ai L (2018). Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* J23, Isolated from Chinese Traditional Fermented Milk. *Front Microbiol* 9: 2165.
- Zhang M, Dong X, Huang Z, Li X, Zhao Y, Wang Y, Zhu H, Fang A, Giovannucci EL. Cheese consumption and multiple health outcomes : an umbrella review and updated meta-analysis of prospective studies. *Adv Nutr.* 2023 Sep ;14(5) :1170-1186. Doi : 10.1016/j.advnut.2023.06.007. Epub 2023 Jun 15. PMID : 37328108 ; PMCID : PMC10509445.
- Zhang M, Dong X, Huang Z, Li X, Zhao Y, Wang Y, Zhu H, Fang A, Giovannucci EL. Cheese consumption and multiple health outcomes : an umbrella review and updated meta-analysis of prospective studies. *Adv Nutr.* 2023 Sep ;14(5) :1170-1186. Doi : 10.1016/j.advnut.2023.06.007. Epub 2023 Jun 15. PMID : 37328108 ; PMCID : PMC10509445.

Zhao, C.J.; Kinner, M.; Wismer, W.; Gänzle, M.G.; Wu, J. Effect of Glutamate Accumulation During Sourdough Fermentation with *Lactobacillus reuteri* on the Taste of Bread and Sodium-Reduced Bread. *Cereal Chem. J.* 2015, 92, 224–230.

Zoumpopoulou, G.; Pot, B.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *Int. Dairy J.* 2017, 67, 46–60.

# **Annexe**

## Annexe

### Milieu MRS liquide (Man-Rogosa Sharp)

Pour 1 liter de milieu :

Composition	Quantity
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O	0.5g
Eau distillée (q.s.p)	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min (pH 6.5).

### Milieu MRS BCP

Composition	Quantity
Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Tween 80	1ml
Phosphate de sodium	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.5g
Eau distillée (q.s.p)	1000ml

### Milieu MRS Solide :

-MRS Liquide .....1000ml

-Agar-Agar .....18g

### **Eau physiologie :**

Ingrédients

Composition (g, ml)

● Eau distillée

1000ml

● Nacl

9 g

### **Appareillage :**

Etuve.

Agitateur à plaque chauffante.

Autoclave.

Vortex.

Balance de paillasse.

Microscope optique.

PH mètre.

Micropipette.

Bec bunsen.

Plaque chauffante.

Bain-marie.

### **Milieux de cultures :**

MRS solide.

MRS liquide.

MRS BCP liquide.

Milieu MH solide.

### **Produits chimiques et réactifs**

Les réactifs pour coloration de Gram : Violet de Gentiane, Fuschine, Lugol.

Autre produits et réactifs : alcool, glycérol stérile, huile de paraffine, lait écrémé, eau oxygénée, eau distillée stérile, eau physiologique.

Autres : Eppendorf, cloche de Durham, papier joseph, coton tige stérile, Bicher, tube à essai, les lames Boites pétries, papier joseph, l'anse de platine, spatule.