

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun-Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Nutrition et Technologie Agroalimentaire



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences alimentaires

Spécialité : Agroalimentaire et contrôle de qualité

Présenté par :

M^{elle} BOUAKKEZ Houda F-Z

Mme ZOUBIR Imen

Thème

**Effet de l'immobilisation des *Streptococcus* par des particules
argileuses sur les qualités du yaourt**

Soutenu publiquement le 25/06/2019

| Jury: | | Grade |
|---------------|-------------------|-------|
| Président: | Mr. Hadj Saïd A. | MCA |
| Encadreur: | Mr. Benbeguara M. | MAA |
| Co-encadreur: | Mme. Moulay M. | MCA |
| Examineur : | Mr. Hocine L. | MCA |

Année universitaire 2018-2019

REMERCIEMENT

Nous tenons à remercier tout d'abord Allah de nous avoir donné la puissance, le courage ainsi que la volonté pour avoir réalisé ce travail.

Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à notre promoteur **Mr. BenBeguara M.** qui n'a jamais épargné ni son temps ni ses efforts pour nous conseiller et nous orienter vers le meilleur et nous le remercies aussi pour avoir apporté ses compétences scientifiques à ce travail.

Un merci spécial s'adresse à **Mme Moulay M.** pour son aide considérable et ses conseils précieux, pour être toujours présente pour répondre à nos besoins durant la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier également **Mr.Hadj Said A.** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury ainsi que **Mr Houcine L.** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Sans oublier l'aide précieuse de l'équipe des laboratoires de microbiologie et de technologie agro-alimentaire.

Notre remerciement vont ainsi à ceux ou celles qui ont contribué de près ou loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Liste des abréviations

°D : Degré Dornic

H⁺ : Ions d'hydrogène

Lb : *Lactobacillus*

M17: Milieu de tarzaghi

MRS: Man Rogosae et Sharp

nm : Nanomètre

trs : Tours

UFC : Unité Formant Colonies

+ : Positif

Liste des figures

| Numéro | Titre | page |
|---------------|--|-------------|
| 1 | Protocole expérimental. | 09 |
| 2 | Les étapes de purification de l'argile. | 10 |
| 3 | Les étapes de la fabrication de yaourt ferme. | 16 |
| 4 | Cinétique de croissance bactérienne par la mesure de la densité optique. | 25 |
| 5 | Cinétique de croissance bactérienne par la technique de spots. | 26 |
| 6 | La variation de pH et Acidité en fonction du temps. | 28 |

Liste des tableaux

| Numéro | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 1 | Composition de lait de vache. | 02 |
| 2 | Les types de yaourt. | 03 |
| 3 | Verreries, appareillages et autres. | 08 |
| 4 | Les poids de papier filtre avant et après la filtration. | 21 |
| 5 | Caractère morphologique de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> . | 23 |
| 6 | Evaluation sensorielle du yaourt. | 30 |

Liste des photos

| Numéro | Titre | Page |
|---------------|---|-------------|
| 1 | Aspect macroscopique des colonies de <i>Streptococcus thermophilus</i> ensemencée en surface sur milieu M17 après 24h d'incubation à 44°C. | 22 |
| 2 | Aspect macroscopique des colonies de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ensemencée en profondeur sur milieu MRS après 48h d'incubation à 44°C. | 22 |
| 3 | Aspect microscopique de <i>Streptococcus thermophilus</i> après coloration de Gram (x100). | 23 |
| 4 | Aspect microscopique des colonies de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> après coloration de Gram (x100). | 23 |
| 5 | Test de catalase. | 24 |
| 6 | Test de type fermentaire. | 24 |

| | |
|------------------------|------|
| Liste des abréviations | i |
| Liste des figures | ii |
| Liste des tableaux | iii |
| Liste des photos | iiii |

Sommaire

| | |
|-------------------|----|
| Introduction..... | 01 |
|-------------------|----|

Partie I : synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| 1. Lait..... | 02 |
| 1.1. Définition..... | 02 |
| 2. Yaourt..... | 02 |
| 2.1. Définition..... | 02 |
| 2.2. Composition nutritionnelle du yaourt..... | 03 |
| 3. Les bactéries lactiques..... | 03 |
| 3.1. Définition..... | 03 |
| 3.2. <i>Les lactobacilles</i> | 04 |
| 3.3. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 04 |
| 3.4. <i>Streptocoques</i> | 04 |
| 3.5. <i>Streptococcus thermophilus</i> | 05 |
| 4. Immobilisation..... | 05 |
| 4.1. Définition..... | 05 |
| 4.2. Techniques d'immobilisation..... | 05 |
| 5. Argiles..... | 06 |
| 5.1. Définition..... | 06 |
| 5.2. Bentonite..... | 06 |

Partie II : partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Les objectifs de l'étude..... | 07 |
| 2. Lieu et période de travail..... | 07 |
| 3. Matériel et méthodes..... | 07 |
| 3.1. Produits et matériel utilisés..... | 07 |
| 3.1.1. Produits..... | 07 |
| 3.1.1.1. Matière premières et leur origine..... | 07 |
| 3.1.1.2. Produits chimiques et milieux de cultures utilisés..... | 08 |
| 3.1.2. Matériel..... | 08 |
| 3.2. Méthodes..... | 09 |
| 3.2.1. Protocole expérimental..... | 09 |
| 3.2.2. Préparation de la suspension d'argile..... | 10 |
| 3.2.2.1. Purification de l'argile..... | 10 |
| 3.2.2.2. Détermination de la concentration en argile..... | 11 |
| 3.2.3. Caractérisations des bactéries lactiques..... | 12 |
| 3.2.3.1. Isolement et ré-identification des souches..... | 12 |
| 3.2.3.1.1. Techniques d'isolement..... | 12 |
| 3.2.3.1.2. Purification..... | 12 |
| 3.2.3.2. Identification des souches..... | 13 |
| 3.2.3.2.1. Test morphologique..... | 13 |
| 3.2.3.2.1.1. Examen macroscopique..... | 13 |
| 3.2.3.2.1.2. Examen microscopique..... | 13 |
| 3.2.3.2.1.2.1. Coloration de Gram..... | 13 |
| 3.2.3.2.2. Test biochimique..... | 13 |
| 3.2.3.2.2.1. Test de catalase..... | 13 |
| 3.2.3.2.2.2. Type fermentaire | 14 |
| 3.2.3.3. Conservations des souches..... | 14 |
| 3.2.3.3.1. Conservation à courte durée..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3.4. Préparation des levains..... | 14 |
| 3.2.3.4.1. Standardisation des souches..... | 14 |
| 3.2.3.4.2. Préparation de levain de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (libre)..... | 14 |
| 3.2.3.4.3. Préparation de levain de <i>Streptococcus thermophilus</i> immobilisée..... | 15 |
| 3.2.4. Fabrication de yaourt..... | 15 |
| 3.2.4.1. Préparation du lait..... | 15 |
| 3.2.4.2. Fermentation..... | 15 |
| 3.2.4.3. Incubation et refroidissement..... | 15 |
| 3.2.5. Cinétiques de croissance bactérienne et des paramètres physico-chimiques..... | 17 |
| 3.2.5.1. Cinétiques de croissance bactérienne..... | 17 |
| 3.2.5.1.1. Technique de spots..... | 17 |
| 3.2.5.1.2. Densité optique..... | 17 |
| 3.2.5.2. Cinétique des paramètres physico-chimiques..... | 18 |
| 3.2.5.2.1. pH..... | 18 |
| 3.2.5.2.2. Acidité titrable..... | 18 |
| 4. Analyse sensorielle du yaourt..... | 20 |

Chapitre II : résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Argile..... | 21 |
| 1.1. Détermination de la concentration en argile de la suspension siphonnée..... | 21 |
| 2. Caractérisation de la souche..... | 22 |
| 2.1. Isolement et purification..... | 22 |
| 2.1.1. Caractérisation morphologique..... | 22 |
| 2.1.1.1. Examen macroscopique..... | 22 |
| 2.1.1.2. Examen microscopique..... | 23 |
| 2.1.2. Caractérisation biochimique..... | 24 |
| 2.1.2.1. Test de catalase..... | 24 |
| 2.1.2.2. Test de type fermentaire..... | 24 |
| 3. yaourt..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 3.1. Cinétique de croissance bactérienne..... | 25 |
| 3.2. Analyse physico-chimiques..... | 28 |
| 3.2.1. pH et Acidité..... | 28 |
| 4. Analyse sensorielle du yaourt..... | 30 |
| | |
| Conclusion..... | 31 |
| Références bibliographiques | |
| Annexe | |

Le lait fermenté est un produit obtenu par ensemencement avec des micro-organismes appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit. La coagulation ne doit pas être obtenue par d'autres moyens que ceux qui résultent de l'activité des micro-organismes utilisés (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide due à deux ferments spécifiques : *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* qui sont présents naturellement dans le lait, ils participent à l'élaboration des qualités organoleptiques, hygiéniques et probiotiques du produit (**Guillouard et al., 2004 ; Fredot, 2009**).

Dans l'industrie laitière, les bactéries se retrouvent la plupart du temps sous forme immobilisée .cette forme de croissance immobilisée réside dans la formation de biofilms, qui peuvent être définis comme une communauté bactérienne adhérent sur une surface (**Ibrahim et al., 2004**).

L'immobilisation cellulaire par adsorption à un support solide est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces qui est obtenue par la mise en contact du support et des cellules actives pendant une période définie (**Doleyres, 2003**).

Les supports d'immobilisation peuvent être de nature minérale tel que l'argile grâce à leur capacité d'adsorption (**Doucet, 2006**).

Afin d'améliorer la qualité nutritionnelle et technologique de yaourt, nous avons pensée à immobiliser l'une des bactéries spécifiques de yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus*.

L'objectif principal du présent travail, est basé sur l'immobilisation par adsorption de *Streptococcus thermophilus* sur un support argileux pour voir l'effet de cette fixation sur les qualités du yaourt.

1. Lait

1.1. Définition

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée». il doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présente toutes les garanties sanitaires (**Jeantet et al., 2008**).

Selon **Jeantet et al., (2017)** le lait est un milieu multiphasique, constitué d'une phase aqueuse continue comporte essentiellement le lactose, des minéraux et des éléments dispersés de nature lipidique (globules gras) et de nature protéique (micelles de caséines). La composition de lait est donnée dans le tableau 1.

Tableau1.composition du lait de vache (**vignola, 2002**).

| Constituants majeurs | Variations limites (%) | Valeur moyenne(%) |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| Eau | 85,5-89,5 | 87,5 |
| Matière grasse | 2,4-5,5 | 3,7 |
| Protéines | 2,9-5,0 | 3,2 |
| Glucides | 3,6-5,5 | 4,6 |
| Minéraux | 0,7-0,9 | 0,8 |

Le lait peut être transformé par action microbienne en produits ayant acquis de nouvelles qualités alimentaires et organoleptique et présentant une conservation accrue : yaourt, laits acidifié (**Guiraud, 2003**).

2. Yaourt

2.1. Définition

Le yaourt est un lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, Par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (**Raiffaud, 2017**).

Ces bactéries doivent se retrouver vivantes à la concentration de 10^7 germe/g de produit. Elles sont aussi thermophiles et dégradent le lactose en acide lactique à partir de 45°C dont la teneur doit être au moins de 0,7 % dans le produit fini (**Fredot, 2009**).

2.2. Composition nutritionnelle du yaourt

La composition nutritionnelle moyenne d'un yaourt est de 80-90% d'eau, de 4 à 18 g/100 g de glucides, de 2,8 à 4,3 g/100 g de protéines, de 0 à 3,5 g/100 g de lipides, de sels minéraux, dont du calcium (150mg/100 g), et en vitamines du groupe B (**Savadogo et Traore, 2011**). Le tableau 2 illustre les différents types de yaourts.

Tableau 2 : Les types de yaourt (**Fredot, 2009**).

| La consistance | Teneur en matière grasse | Le goût |
|----------------|--------------------------|-------------------|
| Yaourt ferme | Yaourt maigre | Yaourt nature |
| Yaourt à boire | Yaourt au lait entier | Yaourt sucré |
| Yaourt brassé | | Yaourt aromatisé |
| | | Yaourt aux fruits |

3. Les bactéries lactiques

3.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Doleyres, 2003**).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers (**Drouault et Cortheir, 2001**).

Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactiques à partir de la fermentation des sucres (**Badis et al., 2005**).

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

Les bactéries lactiques jouent un rôle majeur dans l'industrie alimentaire et particulièrement dans l'industrie laitière.

3.2. Les lactobacilles

Ce genre regroupe des bactéries en forme de bâtonnets plus ou moins long ou en forme de coccobacilles, immobile ou non.

Trois espèces thermophiles sont principalement utilisées ou isolées des produits laitiers en général ; *Lb.lactis*, *Lb.helveticus* et *Lb.bulgaricus* (**Dridier et Prévost, 2009**).

3.3. *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus est une bactérie lactique homofermentaire peu utilisée en fromagerie, mais constitue l'une des deux bactéries impliquées dans la fabrication des yaourts (en association avec *Streptococcus thermophilus*) (**Dridier et Prévost, 2009**).

Selon **Guillouard et al., (2004)** elle est probablement l'espèce la plus rapide à croître et à acidifier dans une plage de température entre 30 et 40°C, outre sa fonction d'acidification du lait par fermentation du lactose en acide lactique, *Lactobacillus bulgaricus* participe également à l'élaboration des qualités organoleptique, hygiénique et probiotiques du produit.

3.4. Streptocoques

La famille des « Streptocoques »(*Streptococcaceae*) généralement groupés en paires ou surtout en chaînes de longueur variable (**Guiraud, 1998**).

3.5. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus se présente sous une forme ovoïde et s'organise généralement en longues chaînes. Comme l'ensemble des membres de son genre, c'est une bactérie homo fermentaire et produisant uniquement du L-lactate. C'est actuellement le seul streptocoque utilisé volontairement dans la fabrication des fromages et les produits laitiers (yaourts, laits fermentés) (**Dridier et Prévost, 2009**).

Dans l'industrie laitière, les bactéries se retrouvent la plupart du temps sous une forme immobilisées, cette forme de croissance immobilisée réside dans la formation de biofilms (**Ibrahim, 2004**).

4. Immobilisation

4.1. Définition

L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes dans un système de fermentation et d'obtenir des hautes densités de biomasse (**Bergmaier, 2002**).

D'après **Doleyres (2003)**, cette technologie, comparativement aux systèmes à cellules libres, permet d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu, limite les risques de contamination, augmente la stabilité plasmidique, et dans l'immobilisation de différentes bactéries lactiques, permet d'obtenir un équilibre stable entre les populations relarguées.

4.2. Techniques d'immobilisation

Les principales techniques visant à la formation d'un confinement cellulaire peuvent être regroupées en cinq types :

- ✓ L'adsorption ;
- ✓ La floculation ;
- ✓ L'inclusion ;
- ✓ La liaison covalente ;
- ✓ Rétention par procédés membranaires (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

La technique d'immobilisation cellulaire par adsorption à un support solide qui est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces. Cette technique imite l'environnement

naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développant en biofilms. L'adsorption est obtenue par la mise en contact du support et des cellules actives pendant une période définie dans le bioréacteur (**Doleyres ,2003**).

Les supports utilisés sont de nature organique ou inorganique (minéraux), mais les supports inorganiques sont généralement plus stables et résistant aux bactéries, parmi les supports inorganiques on trouve les argiles.

5. Argiles

5.1. Définition

Les argiles sont des silicates d'aluminium plus ou moins hydratés, microcristallins, à structure en feuillets (phylolithes) ; elles sont douées de propriétés particulières : par leurs charges négatives, elles retiennent des cations sous la forme échangeable ; certaines ont la capacité d'adsorber de l'eau entre les feuillets (argiles gonflantes) ce qui provoque d'importantes variations de volume entre les saisons sèches et humides (**Calvet, 2013**)

La capacité d'adsorption, et par conséquent, d'échange est nettement importante chez la montmorillonite, l'illite et la vermiculite, qui sont de type 2-1, dont les cristaux comprennent des feuillets de silice et des feuillets d'aluminium tels que la bentonite (**Doucet, 2006**).

5.2. Bentonite

La bentonite est une argile smectique à haute pouvoir décolorant et provenant d'anciennes cendrées volcanique Fort Benton dans le Montana(USA) (**Lozet et Mathieu, 2002**).

Selon **ARTEP (1989)**, Il y a deux sortes de bentonites naturelles :

- Les bentonites sodiques qui sont les plus rares (gisements du Sud Dakota, Wyoming) ont un pouvoir de dispersion en eau douce élevée.
- Les bentonites calciques que l'on trouve dans la plupart des gisements y compris Wyoming ont un pouvoir de dispersion beaucoup plus faible.

1. Les objectifs de l'étude

Les objectifs de notre étude s'articulent autour des points suivants :

- ❖ Isolement et identification des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) à partir d'un yaourt.
- ❖ Voir l'effet de l'immobilisation de *Streptococcus* par des particules argileuses sur la qualité du yaourt.
- ❖ Fabrication d'un yaourt ferme.

2. Lieu et période de travail

Les travaux sont effectués au sein des laboratoires de microbiologie et science alimentaire au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et le laboratoire d'hygiène et pathologie animale au niveau de l'ex ITMA. **Université Ibn Khaldoun- Tiaret.** Pendant une période allant du 10 /02/2019 au 06/04/2019.

3. Matériel et méthodes

3.1. Produits et matériel utilisés

3.1.1. Produits

3.1.1.1. Matière premières et leur origine

- ❖ **Lait** : le lait utilisé dans notre expérimentation c'est un Lait entier en poudre de marque Candia à 26% de matière grasse provient du commerce (**Annexe 01**), et un Lait écrémé à 0% de matière grasse provient de LOROLait.
- ❖ **Bactéries lactiques** : les bactéries utilisées sont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* isolées à partir des yaourts de marque Soummam et RAMDY commercialisés dans la wilaya de Tiaret.
- ❖ **Argile** : l'argile utilisée dans notre travail est la bentonite de maghnia qui provient de Tlemcen de l'ouest d'Algérie.

3.1.1.2. Produits chimiques et milieux de cultures utilisés

- ❖ M17 pour les *Streptocoques* et MRS pour les *Lactobacilles* (**Annexe 02**)
- ❖ Violet de gentiane (1%)
- ❖ Lugol
- ❖ Alcool éthanol (96%)
- ❖ Fuschine (1%)
- ❖ L'eau oxygénée H₂O₂

3.1.2. Matériel :

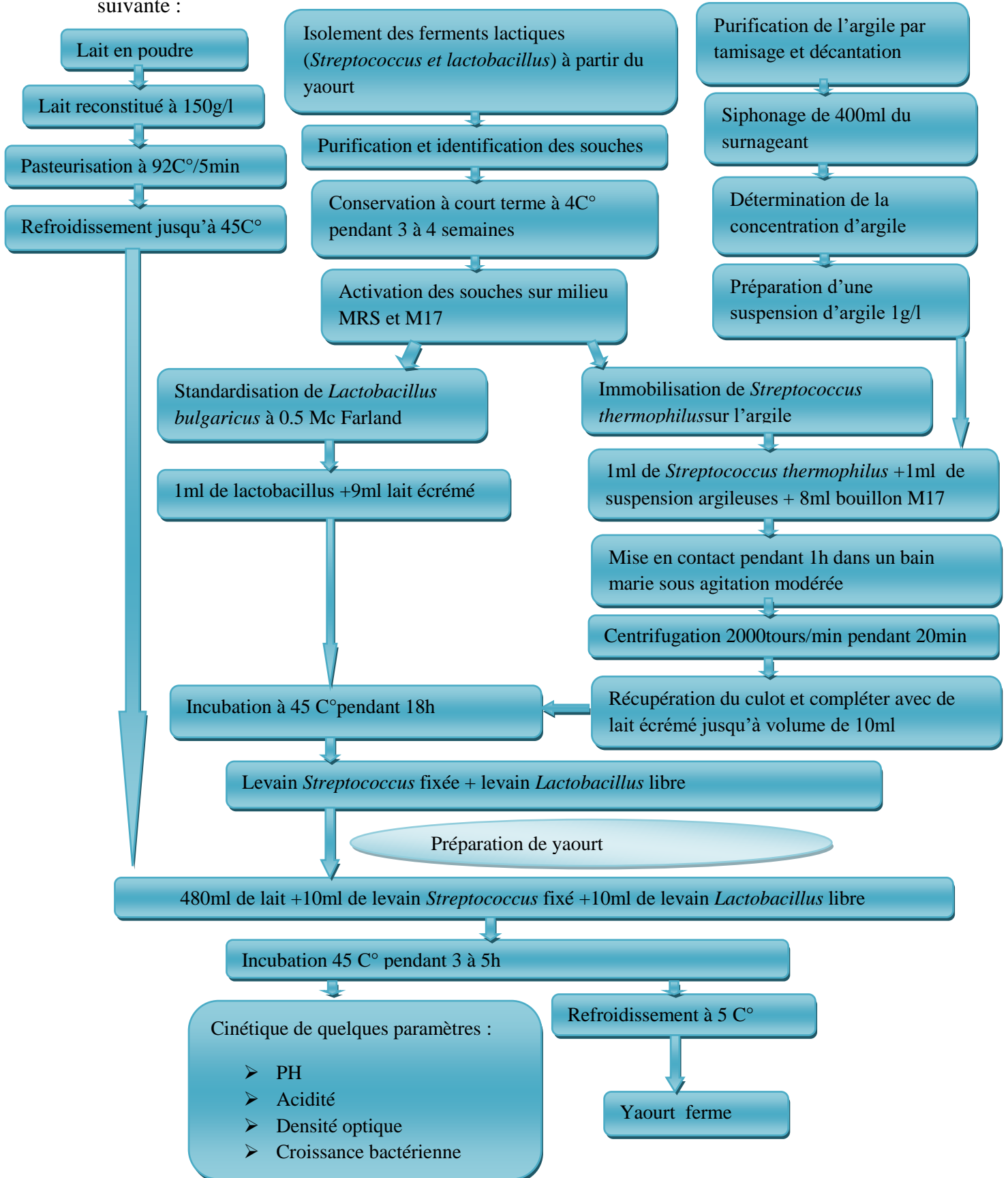
Le matériel utilisé dans notre partie expérimentale est résumé dans le tableau 03

Tableau 03 : verreries, appareillage et autres.

| Verreries | appareillage | autre |
|--|--|-----------------------|
| Béchers (100, 250, 500 et 1000ml) | Agitateur magnétique (STUART/SB162) | Barreau magnétique |
| burettes graduée (10ml) | Autoclave | Papier aluminium |
| Dessiccateur | Spectrophotomètre UV.V (BIOCHROM/Libra S6) | Papier film |
| Eprouvettes graduées (10, 500 et 1000ml) | Bain marie secoueur (MEMMERT) | Papier filtre |
| Entonnoir | Balance analytique (SARTORIUS BASIC) | Pissettes |
| Pipettes graduées (1, 2, 5 et 10ml) | Centrifugeuse (SIGMA 203) | Seringues (5 et 10ml) |
| Tubes à essais | Etuve (MEMMERT) | Spatules |
| Verres de montre | pH-mètre (HANNA) | Tamis (50µm) |
| Micropipette (10µl) | Pompe à vide | Pince |
| Fiole jaugé (50 et 100ml) | Réfrigérateur (CONDOR) | |
| Cuve spectrophotométrie en verre | Vortex | |

3.2. Méthodes

3.2.1. Protocole expérimental : Notre protocole expérimental est présenté dans la figure suivante :



3.2.2. Préparation de la suspension d'argile

3.2.2.1. Purification de l'argile

Les étapes de la purification d'argile sont indiquées dans la figure 2

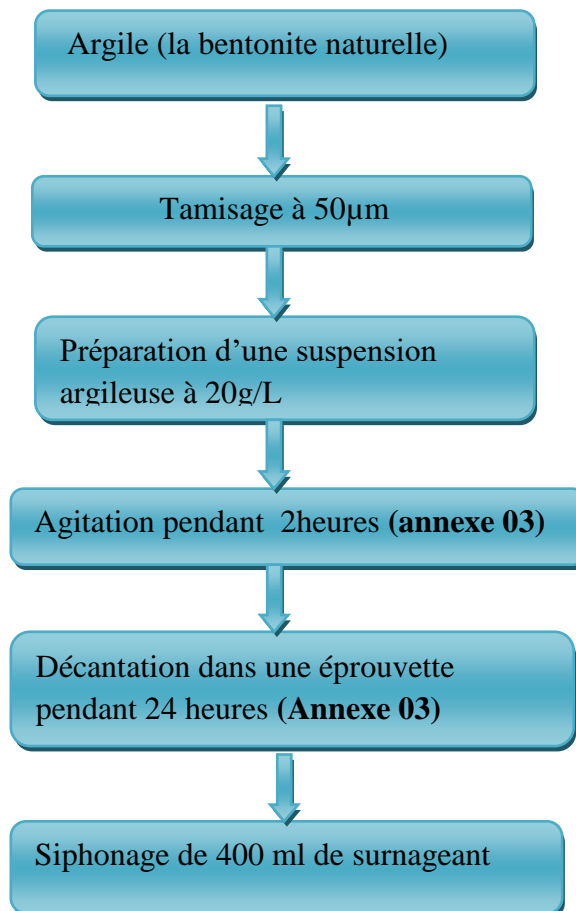


Figure 2 : Les étapes de purification de l'argile

3.2.2.2. Détermination de la concentration en argile

La concentration d'argiles est déterminée comme suit :

- ✓ Sécher le papier filtre dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant Ps_1 ;
- ✓ Prélever 50 ml de la suspension argileuse siphonnée et la filtrer avec une pompe sous vide ;
- ✓ Récupérer le papier filtre et le sécher dans l'étuve à 105°C pendant 30min jusqu'à poids constant Ps_2 ;
- ✓ Après chaque séchage mettre le papier filtre dans le dessiccateur pendant 10 min à fin d'éviter la fixation de l'humidité, (**Annexe 03**).

La détermination de la concentration en argile est donnée par la formule suivante :

$$C_a = (Ps_2 - Ps_1) / v$$

Dont :

- ❖ C_a : concentration en argile en g/l
- ❖ V : volume de la prise d'essai en ml

Une fois la concentration en argile est déterminée on prépare une solution à 1g/l d'argile pour l'utiliser ultérieurement. En appliquant la formule suivante :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Dont :

- C_1 : la concentration en argile de la suspension siphonnée ;
- C_2 : la concentration de la solution argileuse à préparer (1g/l) ;
- V_1 : volume à prélever qu'on le cherche ;
- V_2 : volume de la suspension préparé 50ml.

3.2.3. Caractérisations des bactéries lactiques

3.2.3.1. Isolement et ré-identification des souches

L'isolement des bactéries lactiques a été fait à partir de deux échantillons de yaourt de marque RAMDY et Soummam. (**Annexe 04**)

On effectue des dilutions décimales dans l'eau distillée qui vont en générale de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} .

3.2.3.1.1. Techniques d'isolement

D'après **Labioui et al. (2005)**, le principe de la technique consiste à l'isolement des souches sur milieu M17 et MRS modifié solide, selon les étapes suivantes :

- ✓ Mélanger le contenu du pot de yaourt ;
- ✓ Prélever 1ml de l'échantillon et introduit dans un tube à essai stérile contenant 9ml d'eau distillée stérile ;
- ✓ Faire une homogénéisation à l'aide d'un vortex, on obtient la dilution 10^{-1} ;
- ✓ Prélever 1ml de la dilution 10^{-1} à l'aide d'une pipette graduée stérile et introduit dans un autre tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile ;
- ✓ Répéter l'opération jusqu'à la dilution 10^{-4} ;
- ✓ Agiter manuellement les dilutions pendant 10secondes ;
- ✓ Prélever 0.1ml de chaque dilution et ensemercer en stries et 1ml en profondeur dans les boites à pétri contenant la gélose M17 et MRS modifié ;
- ✓ Incuber les boites à pétri dans l'étuve à 44°C pendant 24 à 72h.

3.2.3.1.2. Purification

La purification est effectuée par repiquage successif des souches sur les deux milieux de cultures M17 et MRS modifié ensemencées en stries et sur bouillon M17 et MRS modifié (solide/liquide), (liquide/solide) (**Labioui et al., 2005**).

Les boites sont ainsi incubées à 44°C pendant 24 à 72h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

3.2.3.2. Ré-identification des souches

❖ Principe

Les tests de confirmation de deux types de ferments du yaourt ont été réalisés par certains tests de base d'identification à savoir : la coloration de gram, test de catalase et le type fermentaire.

3.2.3.2.1. Test morphologique

L'étude de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire pour l'identification.

3.2.3.2.1.1. Examen macroscopique

Ce test s'agit : d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer les paramètres suivants (taille, couleur et formes des colonies).

3.2.3.2.1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : coques ou bacilles, organisés en chainettes ou isolés, bactéries à Gram positif ou négatif (Alexandre et al., 2008).

3.2.3.2.1.2.1. Coloration de Gram

Cette coloration est toujours réalisée en routine lors des premiers examens, elle permet en général d'apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification (Dellaras, 2014)

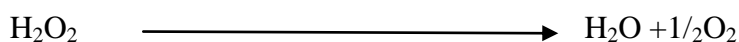
Les étapes de coloration de Gram sont présentées dans l'**Annexe 05**

3.2.3.2.2. Test biochimique

3.2.3.2.2.1. Test de catalase

❖ Principe

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives .elles décomposent l'eau oxygénée formée en eau et en oxygène qui se dégage (Delarras, 2014), selon la formule suivante :



❖ Mode opératoire

Prendre une lame propre .déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose (**Delarras, 2014**).

3.2.3.2.2. Type fermentaire

Selon **Bourgeois et al., (1991)**, Ce test a été effectué par l'ensemencement des souches dans le bouillon MRS et M17 glucosé contenant la cloche de Durham et l'incubation été faite à 44°C, pendant 24 à 48h .le développement d'une bactérie hétéro fermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham qui est absente chez les bactéries homo fermentaires.

3.2.3.3. Conservations des souches

3.2.3.3.1. Conservation à courte durée

Lorsque la conservation est de courte durée, elle consiste le plus souvent à effectuer des repiquages sur milieu gélosé incliné en tube. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C pendant 3 à 4 semaines (**Badis et al., 2005 ; Denis et al., 2007**).

3.2.3.4. Préparation des levains

3.2.3.4.1. Standardisation des souches

La standardisation de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* a été réalisée comme suit :

Des dilutions à partir de bouillon M17 et MRS modifié qui contient *Streptococcus thermophilus* et *lactobacillus bulgaricus* puis lire la densité optique à chaque dilution jusqu'à l'obtention d'une valeur comprise dans l'intervalle de (0,08-0,13) qui correspond à 0,5 Mc Farland.

3.2.3.4.2. Préparation de levain de *Lactobacillus bulagarius* (libre)

Un volume de 1ml de bouillon MRS modifié qui contient *Lactobacillus bulgaricus* standardisé est additionnée à 9ml de lait écrémé puis l'incubé à 44°C pendant 18h.

3.2.3.4.3. Préparation de levain de *Streptococcus thermophilus* immobilisé

L'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* a été réalisée comme suit :

- ✓ Dans un tube à essai mettre 1ml de la culture bactérienne qui contienne *Streptococcus* puis on ajoute 1ml de la suspension argileuse plus 8ml de bouillon M17 ;
- ✓ Laisser le mélange dans un bain marie secoueurs pendant 1h ;
- ✓ Faire la centrifugation à 2000trs/min pendant 20mn ;
- ✓ Lire la densité optique du surnageant à 625nm ;
- ✓ Eliminer le surnageant, et récupérer le culot puis compléter avec de lait écrémé jusqu'à volume de 10ml ;
- ✓ Incuber à 44°C pendant 18h.

3.2.4. Fabrication de yaourt

La préparation de yaourt a été réalisée, en respectant le diagramme de fabrication d'un yaourt ferme donné par **Jeantet, (2008)** selon les étapes suivantes :

3.2.4.1. Préparation du lait

Une quantité de 150g de poudre de lait est dissoute dans un litre d'eau minérale de marque Saïda et homogénéisé sous agitation, le lait reconstitué est pasteurisé à 92 °C pendant 5 min, puis on le refroidit à 45 °C.

3.2.4.2. Fermentation

Le lait préalablement préparé est ensemencé avec les ferments lactiques, une prise d'essai de 480 ml du lait a été ensemencé par des levains lactiques à raison de 10ml de levain *Streptococcus thermophilus* fixé et 10 ml de levain *Lactobacillus bulgaricus* libre.

3.2.4.3. Incubation et refroidissement

Le lait ensemencé est divisé en deux un volume est reparti dans 10 tubes à essai pour suivre la cinétique et l'autre pour la fabrication de yaourt ferme, le tout est incubé dans un bain-marie à 44°C jusqu'à le développement de l'acidité entre 80°D et 100°D. (**Annexe 06**)

Le yaourt est ensuite refroidit à 4°C pour bloquer la fermentation.

L'organigramme suivant illustre les étapes de fabrication de yaourt :

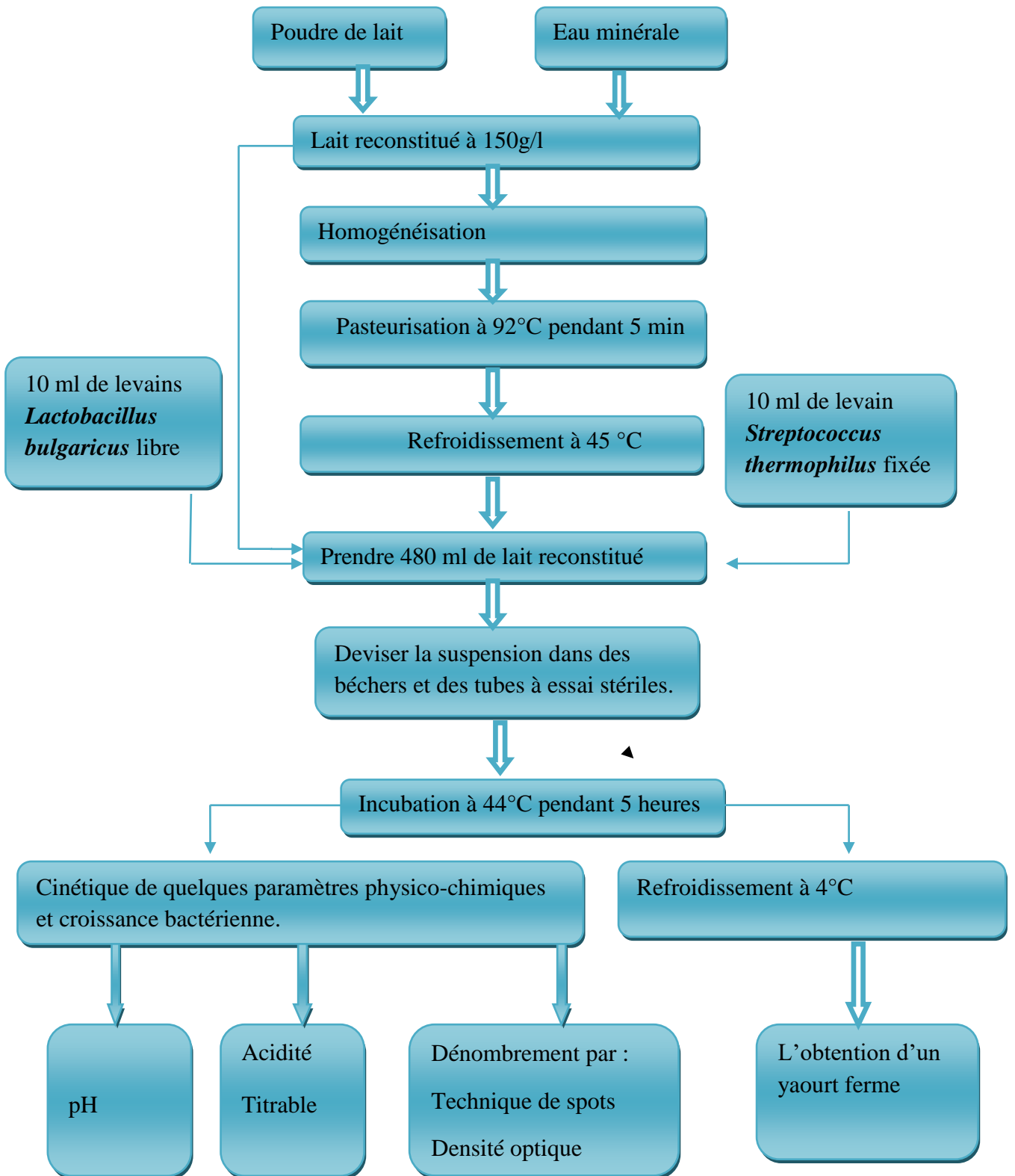


Figure 03: les étapes de la fabrication de yaourt ferme adapté selon Jeantet (2008).

3.2.5. Cinétiques de croissance bactérienne et des paramètres physico-chimiques

La cinétique de croissance bactérienne et des paramètres physico-chimiques est déterminée chaque 30 minute.

3.2.5.1. Cinétiques de croissance bactérienne

La cinétique de la croissance bactérienne a été déterminée par deux techniques :

3.2.5.1.1. Technique de spot

Le dénombrement est une technique permettant de quantifier à l'œil nu le nombre d'unité formant colonies (UFC). On effectue des dilutions successives au dixième dans l'eau distillée et on dépose 10 μ l de chaque dilution bactérienne (spot) sur une surface de gélose MRS, chaque spot est reproduit quatre fois. Après séchage des micro-spots, la boîte de pétri est ensuite retournée puis incubée à l'étuve à 45°C pendant 24 h. Les micro-spots contenant 3 à 60 bactéries sont dénombrés (**Bulard, 2012**). Les résultats sont exprimés selon la relation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

N : nombre total des cellules comptés dans les boîtes de pétri (UFC/ml).

C : nombre des colonies dans la boîte de pétri.

n₁ : nombre des boîtes compté à la dilution la plus faible.

n₂ : nombre des boîtes compté à la dilution la plus élevée.

d : valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

3.2.5.1.2. Densité optique

D'après **Bernard et al., (2012)**, La mesure de l'absorbance consiste à déterminer la densité optique des échantillons à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible en suivant la démarche comme suit :

- ✓ Régler l'appareil à la longueur d'onde 625 nm ;
- ✓ Remplir à l'aide d'une pipette pasteur, une cuve avec « le blanc » qui contient le bouillon M17 ;
- ✓ Placer la cuve dans le logement prévu à cet effet, les faisceaux doivent traverser les faces transparentes de la cuve ;
- ✓ Régler l'appareil de sorte que l'absorbance indiquée soit égale à zéro ;
- ✓ Sortir la cuve, la vider et la rincer avec l'eau distillée et la sécher ;
- ✓ Puis la remplir au deux tiers de la solution contenant nos bactéries ;
- ✓ Placer la cuve dans l'appareil et lire l'absorbance ;
- ✓ Lire la densité optique de chaque dilution utilisée précédemment dans la technique de spots.

Trois dilutions ont été effectuées pour réaliser le dénombrement des bactéries, seulement la dilution 10^{-1} a été retenue pour tracer les courbes. (**Annexe 07**)

3.2.5.2. Cinétique des paramètres physico-chimiques

3.2.5.2.1. pH

❖ Principe

le pH-mètre est l'outil expérimental utilisé pour déterminer l'état d'avancement de la fermentation du yaourt en mesurant son acidité (**Izbaim et al., 2010**).

❖ Mode opératoire

Le pH donne une indication de l'acidité de produit, il est déterminé à partir de la quantité d'ions H^+ contenu dans l'échantillon. (**Bernard et al., 2012**)

- ✓ La mesure a été réalisée avec un pH-mètre étalonné au préalable avec des solutions tampon (pH=4 et pH=7) ;
- ✓ Une fois l'étalonnage réalisé, nettoyer et rincer les électrodes et les plonger dans le bécher contenant 19 ml de notre échantillon ;
- ✓ Attendre la stabilisation puis relever la valeur du pH de l'échantillon ;
- ✓ Rincer à l'eau distillée et sécher les électrodes entre chaque mesure.

3.2.5.2.2. Acidité titrable

❖ Principe

La mesure d'acidité titrable s'exprime couramment de deux façons : soit en pourcentage d'équivalents d'acide lactique, soit en degrés dornic (°D) (**Vignola, 2002**).

❖ Mode opératoire

Le dosage de l'acidité consiste à neutraliser les constituants acides du yaourt par une solution de NaOH (N/9).

Selon **Rhiat et al.(2011)**, les principales étapes de la détermination de l'acidité sont les suivantes :

- ✓ Verser dans un bécher 10 ml de l'échantillon ;
- ✓ Ajouter quelques gouttes de phénolphaléine ;
- ✓ Remplir la burette avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1/9N et éviter la présence des bulles d'air ;
- ✓ Titrer à l'hydroxyde de sodium jusqu'au virage d'une couleur rose qui persiste quelques secondes ;
- ✓ Enregistrer le volume de NaOH qui a été ajouté.

La détermination de la valeur d'acidité est donnée par la formule suivante :

$$A=10 \times V$$

A= acidité exprimée en degré Dornic (1°D= 0,1g d'acide lactique).

V= volume de soude ajouté en ml.

4. Analyse sensorielle du yaourt

L'analyse sensorielle consiste dans un ensemble de méthodes dont le but est de mesurer les perceptions sensorielles du destinataire. Il s'agit de mesurer la vue, l'ouïe, l'odorat, le goût et/ou le toucher (**Leprince,2007**).

Selon **Titeli et Kessoum (2017)** L'analyse sensorielle a pour objectif de décrire les caractéristiques organoleptiques des produits, de façon objective et qualifiable.

Les propriétés organoleptiques sont essentiellement :

- ✓ L'apparence (couleur, aspect) révélée par la vision ;
- ✓ La saveur (arôme, saveur) révélée par l'odorat et le gout ;
- ✓ La texture (résistance, consistance) révélée par le toucher.

Le jury de dégustation est composé par des enseignants, des ingénieurs de laboratoire et des étudiants, La dégustation a été faite au niveau de laboratoire de microbiologique de la Faculté des Sciences des la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun –Tiaret.

1. Argile

1.1. La concentration en argile de la suspension siphonnée

Les valeurs de poids du papier filtre avant et après la filtration des 50 ml sont indiquées dans le tableau suivant.

Tableau 4. Le poids du papier filtre avant et après filtration.

| Les pesées | Poids(g) avant filtration | Poids (g) après filtration |
|------------------------|--|--|
| 1 ^{ère} pesée | P ₁ =1,2025 | P ₁ =1,9766 |
| 2 ^{ème} pesée | P ₂ =1,2006 | P ₂ =1,9640 |
| 3 ^{ème} pesée | P ₃ =P _{S1} = 1.2006 | P ₄ =P _{S2} = 1,9639 |

La différence des poids stables $\Delta P = P_{S2} - P_{S1}$

$$\Delta P = 1,9639 - 1.2006$$

$$\Delta P = 0.7633g$$

$$C_a = \Delta P(g) / V(L) = 15,266 / 50.10^{-3}$$

$$C_a = 15.266 \text{ g/l}$$

La valeur de concentration en argile de la suspension siphonnée (50 ml) est égale **15.266 g/l**, cette valeur est légèrement supérieure à celle trouvée par **Dahou et al., (2018)**, qui ont trouvé 14 g/l, cette différence est due probablement à la manipulation.

Une fois on détermine la concentration de la suspension en argile, on prépare par la suite, une solution argileuse à une concentration de 1g/l.

En appliquant la formule suivante : $C_1.V_1 = C_2.V_2$

$$15,266. V_1 = 1. 0,050$$

$$V_1 = 0,005 / 15,266$$

$$V_1 = 0,0032 \text{ L}$$

$$V_1 = 3,2 \text{ ml}$$

Le volume à prélever est de 3.2 ml et le compléter avec l'eau distillée jusqu'à 50ml.

2. Caractérisations des souches

2.1. Isolement et purification

2.1.1. Caractérisation morphologique

L'étude des caractères macroscopiques et microscopiques permet l'identification du genre et de l'espèce dans certains cas.

2.1.1.1. Examen macroscopique

Les deux photos 1 et 2 illustrent l'examen macroscopique des souches isolées à partir du yaourt de marque RAMDY et Soummam.

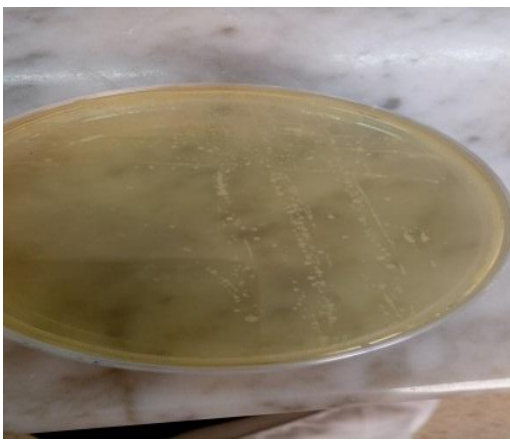


Photo1 aspect macroscopique des colonies *Streptococcus thermophilus* ensemencé en surface sur milieu M17 après 24h d'incubation à 44°C.



photo2 aspect macroscopique des colonies de *Lactobacillus bulgaricus* ensemencé en profondeur sur milieu MRS modifié après 48h d'incubation à 44°C.

D'après les photos précédentes, nous observons que les colonies des deux souches sont de petites tailles, couleurs blanchâtres et de surfaces lisses. Ces résultats sont identiques à celle mentionnées par **Benmouna, (2012)**.

2.1.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique est basé sur la coloration de Gram des souches isolées les résultats sont présentés dans les photos suivantes :

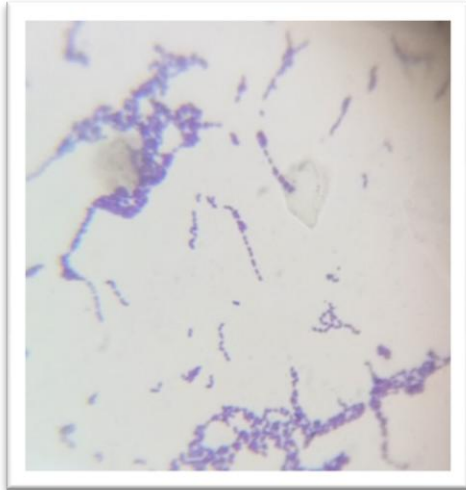


Photo3 aspect microscopique de *Streptococcus thermophilus* après coloration de Gram (x100).



photo4 aspect microscopique de *Lactobacillus bulgaricus* après coloration de Gram (x100).

Le tableau suivant résume les caractères macroscopiques et microscopiques des isolats :

Tableau 5. Caractère morphologique de *treptococcus thermophilus* et *lactobacillus bulgaricus*

| souches | Aspect (gélose) | Aspect (bouillon) | Forme des cellules | Gram | Arrangement |
|-----------------------------------|--|----------------------------|-------------------------------|---------|---|
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | Petite taille 1 à 2mm de diamètre, blanchâtre, surface lisse | Des troubles dans le tube. | Cocci | positif | En paire (diplocoque) ou en chaînettes. |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 1 à 2mm de diamètre, blanchâtre, lisse à crémeuse. | Des troubles dans le tube. | Bâtonnets plus ou moins longs | positif | Isolées, en courtes chaînes. |

Après coloration de gram l'observation microscopique a révélé que nos souches lactiques sont Gram positif, les différentes formes observées sont décrites comme suit :

- ✓ Des coques soit en paire (diplocoque) et en chaînettes.
- ✓ Des bacilles disposés en courtes chaînes ou isolées.

Ces caractéristiques concordent à celles décrite par **Dellaras, (2014)**.

2.1.2. Caractérisation biochimique

2.1.2.1. Test de catalase

Les résultats de ce test sont présentés dans la photosuivante :



Photo 5 test de catalase

D'après la photo précédente nous observons aucune effervescence n'apparaît pour les deux espèces donc elles sont de catalase négative, selon **Dellaras, (2014)**, nos souches sont dépourvues de cette enzyme c'est ce qui prouve leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

2.1.2.2. Test de type fermentaire

Les résultats de ce test sont présentés dans la photo suivante :

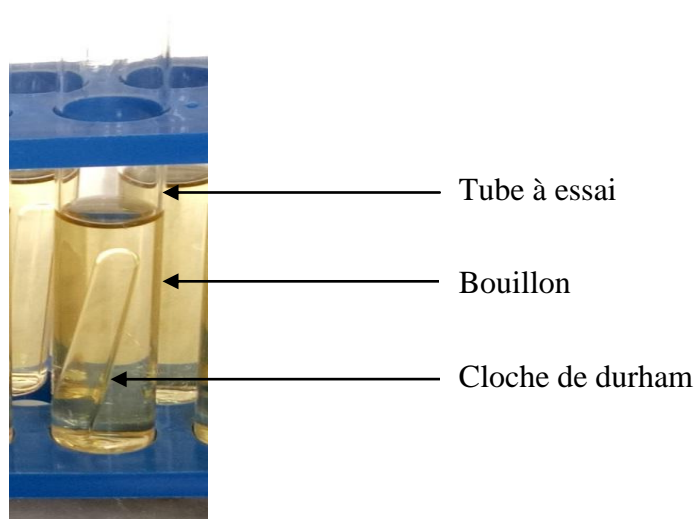


Photo 6.Test de type fermentaire

D'après la photo précédente nous observons qu'il n'y a aucun gaz dégagé dans les cloches, et selon **Alexandre et al., (2008)**, ces souches sont de type homo-fermentaire.

3. Yaourt

Selon **Izbaim et al., (2010)**, la qualité du yaourt peut être examinée à partir de différents aspects en utilisant des méthodes différentes permettant l'analyse de ses caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques.

3.1. Cinétique de croissance bactérienne

Afin de confirmer l'évolution du nombre des bactéries en fonction du temps nous avons adopté deux méthodes de dénombrements (densité optique et technique de spots).

Les résultats de la cinétique de croissance bactérienne sont présentés dans les figures 4 et 5

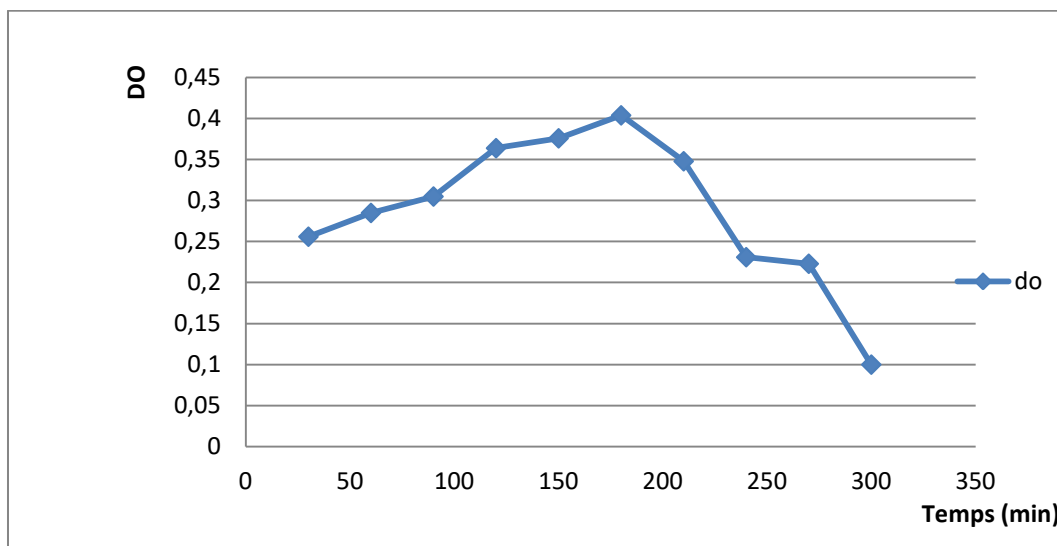


Figure 4. Cinétique de croissance bactérienne par la mesure de la Densité optique.

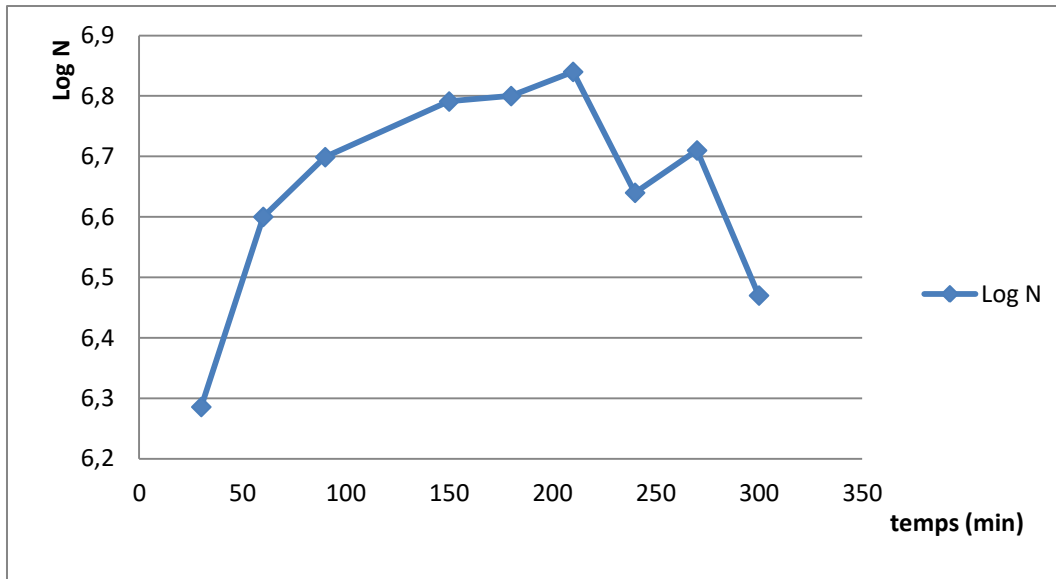


Figure 5. Cinétique de croissance bactérienne par la technique de spots.

Nous observons que les phases de la courbe de croissance illustrées dans la figure 4 est proche à celle présentées sur la figures 5.

D'après les deux figures 4 et 5, on remarque que la phase de latence est absente, cela est justifié par l'adaptation préalable de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* durant la préparation des levains lactiques.

Selon **Guiraud, (2012)**, l'abaissement de la durée de la phase de latence est recherché pour certaines applications technologiques : il peut être obtenu en adaptant l'inoculum sur le même milieu (pré -culture) et en augmentant sa taille.

Nous observons que les courbes de croissance commencent directement par une phase exponentielle qui dure 210 min, au cours de laquelle la multiplication cellulaire augmente d'une façon binaire et plus en plus grande, c'est la phase physiologique par excellence (**Guezlane-Tebibel, 2008**).

Elle dépend généralement de plusieurs facteurs : taille de l'inoculum, l'état physiologique de la bactérie et la pré culture (**Budjema et al., 2009**).

En suite une phase de déclin est observée, l'allure des courbes de la croissance bactérienne est décroissante.

Selon **Guiraud, (2012)**, la population ne peut croître indéfiniment dans un milieu non renouvelé. Un ralentissement ou un arrêt de la croissance apparaissent lorsque un nutriment essentiel est épuisé : limitation par le substrat énergétique, la source d'azote, un facteur de croissance. Le milieu devient carencé.

Selon **Corrieu et Luquet, (2008)**, la phase exponentielle dure 4 heures, tandis que les figures 5 et 6 montrent une phase exponentielle de 3 h à 3 h 30 minutes.

L'inoculum est composé de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, dont la charge initiale de cette dernière est supérieure à celle de lactobacille.

Et selon **Corrieu et Luquet, (2008)**, la phase exponentielle de *Streptococcus thermophilus* est de 3 heures. Donc la croissance des bactéries peut être influencée par la charge de l'inoculum.

Il est à signaler que, le temps nécessaire pour atteindre une valeur de pH de 4,96 et une acidité de 78°D est de 4 h 30 à 5 h qui n'est pas synchronisé avec la phase exponentielle des souches, ceci est probablement à cause de la fixation de *Streptococcus thermophilus* par l'argile.

3.2. Analyse physico-chimiques

Dans cette partie de travail nous nous sommes intéressés à des variables physico-chimiques à savoir le pH et l'acidité titrable.

3.2.1. pH et Acidité

Les résultats trouvés sont consignés dans la figure 06.

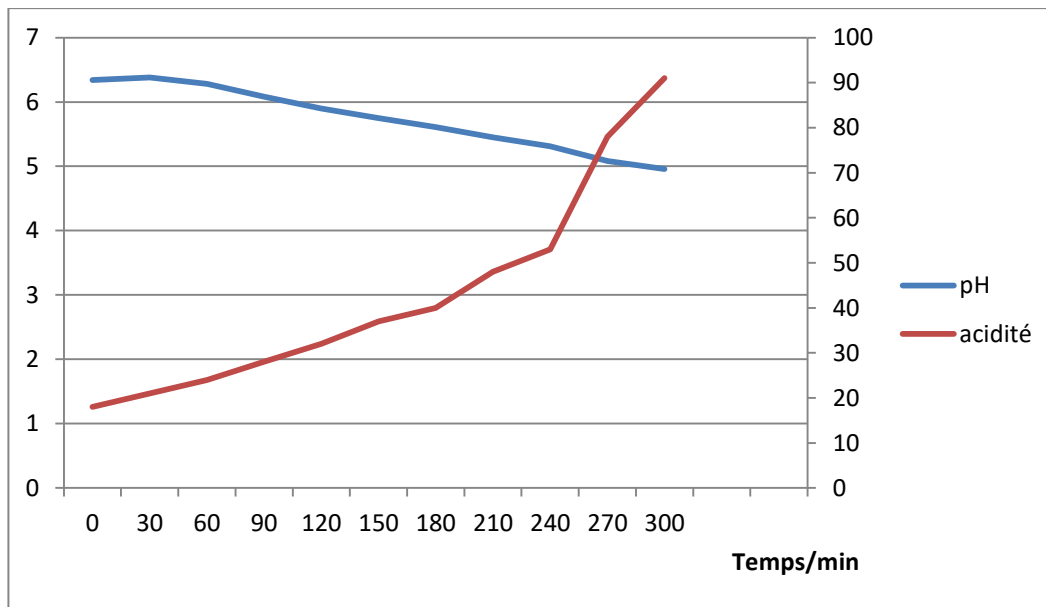


Figure 06: l'évolution de pH et Acidité en fonction du temps.

D'après les courbes illustrées dans la figure 6, nous observons à t_0 que le pH du lait égale à 6,34, qui correspond à une acidité de 18°D ces valeurs sont proches de celles de **vignola, (2002)** et **Fanica, (2008)** soit 6,6-6,8 et 16-18°D et diminue progressivement jusqu'à 4,96 pendant 5h d'incubation, ce résultat est légèrement supérieur à celui donné par **Guillouard et al., (2004)**, qui varie de 4,3 - 4,5.

D'autres part nous constatons que la valeur de l'acidité titrable augmente tout au long de la période de fermentation du yaourt, cette augmentation est due à la production progressive de l'acide lactique par les ferments lactiques, cette dernière est très remarquable durant les 3 dernières heures et atteint 78°D au bout de 4h 30min, Cette valeur est comprise dans l'intervalle donné par **Jeantet et al., (2008)**, soit 70 à 80°D pour le yaourt étuvé et 100 à 120°D pour le yaourt brassé.

Le pH diminue au cours du temps reflétant une augmentation de l'acidité du milieu, étant donné que le lait exposé à une température donnée fixe, subit les transformations à cause

de la présence de bactéries provoquant d'une part la fermentation du lait et la forte acidité par conséquent (**Benayad et al., 2010**).

Il est à signaler que pour atteindre une valeur d'acidité de 78°D il fallait 4h 30min d'incubation et pour une valeur de pH de 4,96 le temps de fermentation dure 5h, alors que dans les conditions normales ces valeurs sont atteintes après 2h 30min à 3h 30min d'incubation **Jeantet et al., (2008)**.

Cette différence dans le temps est due probablement à l'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* sur les particules argileuses.

La diminution du pH et l'augmentation de l'acidité est due principalement à la production d'acide lactique par les ferments lactiques qui est influencé par la teneur en matière sèche du lait mis en œuvre dans la fabrication du yaourt, et la composition du lait ,particulièrement la teneur en lactose.

L'acidification du lait permet de mettre en évidence la synergie existant entre les deux germes en culture mixte, durant la maturation de yaourt, le lactose se transforme en acide lactique sous l'action de *Streptococcus thermophilus*, par la suite cette acidité augmente avec l'activité de *Lactobacillus bulgaricus* jusqu'à une valeur d'acidité comprise entre 70 à 80°D après 3h 30min d'incubation (**Zourari et Desmazeaud, 1991**).

4. Analyse sensorielle du yaourt

Les perceptions des dégustateurs sont illustrées dans les tableaux 6. (100% soit 10 panels).

Tableau 06. Évaluation sensorielle du yaourt (test de dégustation)

| Caractère étudiée | Perceptions | Pourcentage |
|-------------------|-------------|-------------|
| Couleur | blanchâtre | 100% |
| | crème | 0% |
| | jaunâtre | 0% |
| Arôme | Naturel | 100% |
| | Artificiel | 0% |
| Texture | crémeuse | 100% |
| | velouté | 0% |
| | pâteux | 0% |
| Goût | Sucré | 0% |
| | Doux | 70% |
| | Acidulé | 20% |
| | Amer | 10% |
| | Autres | 0% |

A travers les notes attribuées aux différents descripteurs, nous constatons que les membres du panel de dégustation décrivent le yaourt issu de l'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* comme suit : un yaourt ayant une couleur blanchâtre, il a une texture crémeuse, possède un arôme naturel, son goût est bon.

D'après les résultats des tests sensorielles, la qualité de notre produit est acceptable et identique à celui fabriqué industriellement (yaourt nature), l'argile est imperceptible dans le goût de yaourt.

Ce travail nous a permis de préciser l'importance relative de l'immobilisation des *Streptococcus thermophilus* par des particules argileuses sur les qualités du yaourt.

Les résultats des tests microbiologiques et biochimiques ont montré deux espèces différentes (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) qui sont de Gram positifs, catalase négatives et homo-fermentaire, forment des colonies de couleurs blanchâtres, Taille 1 à 2 mm de diamètre, Surface lisse, avec une forme de Cocci pour *Streptococcus thermophilus* et bâtonnets pour *Lactobacillus bulgaricus*.

D'après les résultats de la cinétique de croissance bactérienne on a constaté que , les cellules ne passent pas par une phase de latence, elles commencent directement par une phase exponentielle légèrement courte peut être dû à la composition de la prise d'essai qui est plus chargé en *Streptococcus thermophilus*, suivi par une phase de déclin.

Les résultats de la cinétique des paramètres physico-chimiques, montrent qu'une augmentation progressive de l'acidité de 18°D jusqu'à 78°D et une diminution proportionnelle de pH de 6.38 jusqu'à 4,96 sont atteints au cours de l'incubation. Ceci nous permet de conclure que ce retardement est capable dû à la fixation des *Streptococcus thermophilus* par la bentonite.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives, nous proposons :

Faire varier les paramètres de centrifugation afin de mieux avoir une bonne séparation de molécules fixés et non fixés.

D'utiliser un inoculum composé de proportions égales et importantes de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

D'utiliser des bactéries lactiques immobilisées sur un support argileux pour la fabrication d'un autre produit.

A

Alexandre H., Grandvalet C., Guilloux-Bénatier M., Remize-Barnavon F., Tourdot-Maréchal R., 2008. Les bactéries lactiques en œnologie, éditions TEC &DOC, Lavoisier, p108.

ARTEP., 1989. Spécifications des produits minéraux pour fluides de forage. Editions. TECHNIP, pp 19.

B

Badis A., Loubdia-Sellami N., Guetarni D., Ouzrout R., 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabyle), sciences & technologie C-N°23 pp30-31.

Benayad B., Azzouz S., Benmohamed-Bouaza K., Mebarki-Sennour K., Bennouna S., 2010. Contrôle de la qualité et analyse. O6 les publications universitaire. pp 88.

Bernard A-S., Clède S., Emend M., Monin-Soyer H., Quèrard J., 2012. Techniques expérimentales en chimie. Édition DUNOD Paris. pp 60-74.

Benmouna Z., 2012. Bactériocines des bactéries lactiques : étude biochimique et génétique. Thèse de Magister, Université d'Oran. p 46.

Bergmaier D., 2002. Production d'exopolysaccharide par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb rhamnosus rw -9595m* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat. Université Laval p 35.

Bourgeois C.M., Larpent J.P., 1996. Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Microbiologie Alimentaire Tome 02, 2^{ème} éditions, TEC & DOC, pp57-58-59-60-61.

Bourgeois C.M., Mesclé J F., et Zuca J., 1991. Laites et les produits laitiers non fermentés, Microbiologie alimentaire vol.1, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.

Bulard E., 2012. L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Thèse de doctorat. Université Paris-sud, Paris.

C

Calvet R., 2003. Le sol, édition France agricole. 2^{ème} édition Agri production pp 16-17.

Corrieu G et Luquet F-M. 2008. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Lavoisier Paris .Edition TEC&DOC p 516.

D

Dahou M., Merzoug M., Seghier A. 2018. Cinétique de coagulation du lait par la Fromase 2200 TL immobilisée sur un support argileux, mémoire de master, Université Ibn Khaldoun, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Tiaret, p 20.

Dellaras C., 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et levures, moisissures, Lavoisier Paris., édition TEC&DOC, pp 88-109.

Denis F., Poy M-C., Martin C., Bingen E., Quentin R., 2007. Bactériologie Médicale Technique usuelles. Edition ELSEVIER Masson pp 28-29.

Doleyres Y., 2003. Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées .thèse de doctorat université Laval Québec pp 05-14-15.

Dortu C., Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires, Biotechnol. Agron. Soc .Environ .13(1) p143.

Doucet R., 2006. La science agricole, le climat et les sols agricoles. Éditions berger pp 324

Dridier D., Prevost H., 2009. bactéries lactiques. Édition Economico, pp 321-322-323.

Drouault S., corthier G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé, Vet .Res.32.INRA, EDP Sciences, p103.

F

Fredot E., 2009. Connaissance des aliments bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, édition TEC et DOC, LAVOISIER, p32-34.

Fanica p-o., 2008. Le lait, la vache et le citadin du XVII^e au XX^e siècle, éditions Quæ, p386.

G

Guezlane–Tebibel N., Kahlouche B., Athmani-Guemouri S., 2008, Microbiologie travaux pratiques, office des publications universitaires, édition :1.04.49.73, pp 100-102.

Guillouard I., Lim E-M., Guchte M V., Grimaldi C., Penaud S., Maguin E., 2004.

Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lacobacillus delbrueckiisp. bulgaricu*, Lait 84, INRA, EDP Sciences p 02.

Guiraud J-P., 2003.Microbiologie alimentaire .Edition DUNOD, Paris. pp 92-282-651.

H

HemmeD., WahID., Nardi M., 1980. Variations de l'équipement enzymatique de *Streptococcus thermophilus*, Le Lait, LX, p 111.

I

Ibrahim M., Briandet R., Mistou M-V., 2004. Immobilisation des lactocoques, lait 84, INRA, EDP Sciences, pp 103-104.

Izbaim D., Faiz B., Moudden A.,Taifi N., Aboudaou d-I., 2010. Contrôle ultrasonore du processus de la fermentation du yaourt, 10^{ème} Congrès Français d'Acoustique.

J

Jeantet R., Caguennec T., Mahaut M., Schuck P et Brule G.2008. Les produits laitiers (2^e Ed), Edition TEC&DOC, Lavoisier 3 Paris, p24-25-26-27-29.

Jeantet R., Croguennec T., Garric G., Brulé G., 2017. Initiation à la technologie fromagère, Lavoisier paris TEC&DOC 2^e édition p 01.

L

Labioui H., Elmoualdi L., El yachioui M., Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de Bactéries Lactiques antibactériennes, Bull.Soc.Pharm.Bordeaux.144, p 239.

Leprince c., 2007, les métiers de la biologie et des biotechnologies, L'Etudiant, p 63

Lozet J et Mathieu C., 2002. Dictionnaire de Science du Sol, éditions TEC &DOC, Lavoisier, p62.

R

Raiffaud C., 2017. Transformer les produits laitiers frais à la ferme, 3^{ème} éditions, educagri, p 41.

Rhiat M., Labioui H., Driouich A., Aouane M., Chbab y., Driouich A., Mennane Z., Ouhssine M., 2011. Étude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire, Afrique science 07(03), pp109-110.

S

Savadogo A., Traore A S., 2011. La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés, Int.J.Biol.Chem.Sci.5(5), pp 2060.

T

Titeli W., Kessoum F., 2017. Evaluation des Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du yaourt étuvé fabriqué et commercialisé dans la wilaya de Bejaia cas Ramdy , mémoire de master. Université de Bejaia, p 08.

V

Vignola C L., 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait, école polytechnique de Montréal, fondation de technologie laitière du Québec Inc., pp 29-02-30.

Z

Zourari A., Desmazeaud M-J., 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II. souche de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. Lait 71 Elsevier/INRA, pp 477-478.

ANNEXES

Annexe 01 : Composition de poudre de lait

| Valeurs nutritionnelles moyennes pour 100 g | | |
|---|--------------------------|--|
| تسبة القيمة الغذائية في 100 غ | | |
| Valeur énergétique | 2050 kJ 490 kcal | القيمة الحرارية |
| Lipides | min 26 g | مواد دهنية (غ) |
| dont acides gras saturés | 16,5 g | منها المشبعة (غ) |
| Glucides | 40 g | غلويسيد (غ) |
| dont lactose | 40 g | منها اللاكتوز |
| Protéines | 24,5 g | بروتينات (غ) |
| Protéines sur extrait sec dégraissé | min 34 g | بروتينات من المستخلص الجاف منزوع الدسم (غ) |
| Sel | 1 g | ملح (غ) |
| Calcium | 920 mg (92% des AJR*) | كالسيوم (غ) |
| Vitamines A (EAR) | 450 µg | فيتامين A |
| Vitamines D | 3,75 µg | فيتامين D |

* Apport conseillé recommandé

f CANDIA ALGERIE

Annexe 02 : Choix des milieux gélosés et leurs composition

Le choix du milieu et des conditions d'incubation dépend de la composition microbiologique de l'échantillon à analyser, et cette tâche peut s'avérer très fastidieuse. Un milieu gélosé peut être rendu sélectif du fait de son pH.

Lors des cultures mixtes *streptococcus thermophilus* /*lactobacillus bulgaricus*, l'utilisation de gélose MRS acidifiée à pH 5.5 permet de dénombrer spécifiquement les *lactobacilles*. Le milieu M17 inhibe la croissance de lactobacilles, ce qui permet la numération spécifique de *streptococcus thermophilus* dans le yaourt. (Corrieu et luquet.,2008)

Milieu M17

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Tryptone | 2,50g |
| Peptone pepsique de viande..... | 2,50g |
| Peptone papainique de so..... | 5,00g |
| Extrait autolytique de levure..... | 2,50g |
| Extrait de viande..... | 5,00g |
| Lactose..... | 5,00g |
| Glycérophosphate de sodium... | 19,00g |
| Sulfate de magnésium..... | 0,25g |
| Acide ascorbique..... | 2,50g |
| Agar agar bactériologique..... | 15,00g |
| pH..... | 7,1 |
| Autoclavage..... | 120°C/20min |

Milieu MRS

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande..... | 10g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Glucose..... | 20g |
| Citrate d'ammonium..... | 2g |
| Acétate de sodium..... | 5g |
| Sulfate de magnésium..... | 0,2g |
| Phosphate dipotassique..... | 0,05g |
| Agar..... | 2g |
| Tween..... | 5g |
| sulfate de manganèse..... | 0,05g |
| pH..... | 5,4 |
| Autoclavege..... | 120°C/20min |

Annexe 03 : les préparations de la partie expérimentale



solution argileuse dans une éprouvette
de 1L.



Agitation de la suspension argileuse



Pesage de papier filtre



Elimination de l'humidité dans le
dessiccateur

Annexe 04 : Yaourts utilisés dans notre expérimentation



Annexe 05

Les étapes de la coloration de Gram

Selon **Delarras. (2014)** la coloration de gram est faite comme suit :

- Mettre une goutte d'eau distillée dans une lame ;
- Prélever une colonie avec l'once de platine et mettre dans la lame puis la sécher ;
- verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis ;
- Attendre 1 minute ;
- Eliminer l'excès de violet de gentiane avec l'eau distillé sans insister ;
- Verser quelques gouttes de lugol dans la lame pendant 1 minute ;
- Rincer avec l'eau distillée ;
- Rincer avec l'alcool les deux côtés de la lame ;
- Puis rincer avec l'eau ;
- Prolonger la lame 1 minute dans la fushine ;
- Rincer abondamment à l'eau distillée ;
- sécher la lame à la flamme ;
- Observation microscopique agrandissement (100).

Annexe 06

Répartition de mélange dans un bécher et des tubes à essai



Annexe 07

La variation de pH et Acidité en fonction du temps.

| | | | | | | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Temps (min) | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 |
| pH | 6,34 | 6,38 | 6,28 | 6,08 | 5,90 | 5,75 | 5,61 | 5,45 | 5,31 | 5,08 | 4,96 |
| Acidité (°D) | 18 | 21 | 24 | 28 | 32 | 37 | 40 | 48 | 53 | 78 | 91 |

Lecture de la densité optique et détermination de la charge bactérienne en fonction du temps

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Temps (min) | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 |
| D.O | / | 0,256 | 0,285 | 0,305 | 0,364 | 0,376 | 0,404 | 0,348 | 0,231 | 0,223 | 0,1 |
| log N | / | 6,2857 | 6,6001 | 6,6989 | 6,781 | 6,791 | 6,80 | 6,84 | 6,64 | 6,71 | 6,4 |

Résumé

L'objectif principal de ce travail est de voir l'effet de l'immobilisation des *Streptococcus thermophilus* sur les qualités du yaourt.

L'isolement des bactéries a partir d'un yaourt nous a permis d'identifier deux espèces (*streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*). Le test biochimique a montré que ce sont de Gram positif catalase négative et homo fermentaire.

Le suivi de la cinétique des paramètres physico-chimique et la croissance bactérienne immobilisée au cours de la fermentation du lait a montré que l'acidité a augmenté jusqu'à 78°D et le pH a diminué jusqu'à 4,96 pendant 4h 30min à 5h d'incubation ce temps qui dépasse le temps normale de fermentation des yaourts fermes.

Les mots clés : *streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus bulgaricus*. Immobilisation. Bentonite. Yaourt. Cinétique. Lait.

المخلص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو معرفة تأثير تثبيت *streptococcus thermophilus* على جودة اللبن الزبادي.

عزل البكتيريا من اللبن الزبادي سمح بتعريف نوعين *streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

حيث الفحص البيوكيميائي بين انهما دات غرام موجب . كatalaz سالب و نتيجة التخمر متجانسة

تتبع الحركية الكيميوفيزيائية و الميكروبيولوجية للبن الزبادي المنتوج ببكتيريا مثبتة بين ان ارتفاع الحموضة إلى 78 °D و انخفاض ال pH الى 4.96 اثناء 4 سا و 30د الى 5سا من الحضارة حيث هذا الوقت يتجاوز الوقت العادي للتخمر للبن الزبادي .

الكلمات المفتاحية : *streptococcus thermophilus* . *Lactobacillus bulgaricus* . تثبيت . البنتونيت . اللبن الزبادي . الحركية . الحليب .