

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 des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Mm. Loukrif saadia wafaa

M^{elle}. MAHNOUN khadidja

M^{elle} MAHOUZ kheira

Thème

Effet de l'immobilisation des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) par des particules argileuses sur les qualités du yaourt

Soutenu publiquement le

Jury:		Grade
President:	M. HADJ SAID A.	MCA
Encadreur:	Mm. MOULAY M.	MCA
Co-encadreur:	M. BENBEGUARA M.	MAA
Examineur 1:	M. YEZLI W.	MCB

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

*Avant tout nous remercions **ALLAH** le miséricordieux, Sans Lui nous n'aurons jamais pu achever ce travail.*

*Nous exprimons toute notre gratitude et nos vifs remerciements à notre promotrice **Mm MOULAY M.** qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité.*

*On tient à Remercie notre Co-promoteur **Mr. BENBAGUERA M.** pour leur aide, leurs conseils, soutien morale et surtout leur encouragement et ses remarque pour contenu de ce travail. Merci d'avoir nous guide avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce mémoire*

Nous exprimons notre gratitude à l'égard des membres du jury de soutenance qui ont accepté de juger et d'évaluerez notre travail,

*Nous exprimons toute notre reconnaissance à **Mr. Hadj Saïd A.** pour avoir accepté de présider le jury et pour ses conseils avisés, ainsi que **Mr. YEZLLI W.** Pour avoir examiner ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à tous les enseignants qui se sont acquittés de la lourde tâche de nous prodiguer leur savoir et Savoir faire le long de notre cursus scolaire et universitaire, ceux de la faculté des sciences de la nature et de la vie, tout particulièrement notre responsable de spécialité **Mr. Hocine L.***

*Nous souhaitons aussi exprimer notre profonde gratitude envers tout le personnel du laboratoire de microbiologie notamment: **M^{elle} SOUALMI K** et **Djalouli Z** pour leur disponibilité et orientations éclairées.*

Nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je remercie tout d'abord ALLAH, le miséricordieux de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail :

Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et que je suis très fière de les avoir comme parents et que tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte ma mère ASSIA et mon père MOHAMED et pour leurs soutien et leurs sacrifices énormes.

Ames adorables sœurs : WIAM et WAFAA.

Ames chère frères : BADROU et OUSSAMA.

A mon mari : HAMID.

A toute la famille LOUKRIF.

Ames trinômes : HANEN et KHADIDJA.

A ma promotion de Maser 2 Microbiologie Appliquée 2018-2019.

En fin je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé à réaliser ce travail de près ou de loin sans exception.



WAFAA

Dédicaces

Grace à dieu le tout puissant, qui m'a donné la volonté, et qui m'a éclairé vers le bon chemin, que nul ne peut se faire sans son désir.

Je dédie ce travail :

A mes chers parents en témoignage de ma connaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien toute long de mes études.

A mes chères sœurs : AMEL et BASSMA qui ont veillé sur moi avec leurs grands cœurs.

A mes chères frères : AHMED et NOUR EL DINE.

A toute la famille MAHOUZ, je les remercie pour leur amour et leur soutien.

A mes chères collègues : WAFIA et KHADIDJA.

A toutes la promotion de Microbiologie Appliquée 2018-2019.

A tous ceux que j'apprécie énormément, et qui contribuent à nous rendre la vie plus agréable.



HANEN

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

À mes parents, que j'ai tant aimés et respectés, qui m'ont encouragés et soutenu dans toute ma vie, que dieu

Vous protège et vous octroie une longue et heureuse vie.

À mes grandes parents, je leur souhaite une longue vie.

À mes chers frère : AZIZE et BOUBAKER pour leur aide et leur générosité.

À mes très chères sœurs adorable : FADHILA et FATIHA.

À l'être le plus moins à mon cœur ma tante et à son mari.

À mes trinômes : HANEN et WAFAA.

Et enfin spécial dédicace à ma chère amie HOUDA avec qui j'ai tout partagé ces dernières années.

À toute la promotion Microbiologie Appliquée 2018-2019.



KHADIDJA



Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Liste des photos.....	IV
Introduction.....	01

Première partie : Synthèse bibliographique

1. Lait.....	02
1.1. Définition.....	02
2. Les bactéries lactiques.....	02
2.1. <i>Lactobacillus</i>	03
2.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	03
2.2. <i>Streptococcus</i>	03
2.2.1. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	03
3. Yaourt.....	04
3.1. Définition.....	04
3.2. Types de yaourt.....	04
4. Argiles.....	05
4.1. Définition.....	05
4.2. Bentonite.....	05
5. Immobilisation cellulaire	05
5.1. Immobilisation par adsorption.....	06

Deuxième partie : partie expérimentale

Chapitre I : matériel et méthodes

1. Objectifs du travail	07
2. Lieu 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 première.....	07
3.1.2. Matériel	08

3.2. Méthodes.....	08
3.2.1. Protocole expérimentale.....	09
3.2.2. Préparation de la suspension argileuse.....	10
3.2.2.1. Purification de l'argile.....	10
3.2.2.2. Détermination de la concentration en argile.....	11
3.2.3. Isolement et ré-identification des souches.....	12
3.2.4. Isolement et purification des souches.....	13
3.2.5. Identification.....	13
3.2.6. Etude morphologiques et biochimiques.....	13
3.2.6.1. Etude morphologique.....	13
3.2.6.1.1. Examen macroscopiques.....	13
3.2.6.1.2. Examen microscopiques.....	13
3.2.6.2. Etude biochimiques.....	14
3.2.6.2.1. Mise en évidence de la catalase.....	14
3.2.6.2.2. Type fermentaire.....	14
3.2.7. Conservation à courte durée.....	15
3.2.8. Fixation des bactéries.....	15
3.2.9. Fabrication de yaourt.....	16
3.2.9.1. Reconstitution et traitement du lait.....	16
3.2.9.2. Inoculation et incubation.....	17
3.2.10. Cinétique des paramètres physicochimiques et croissance bactérienne.....	18
3.2.10.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques.....	18
3.2.10.1.1. pH.....	18
3.2.10.1.2. Acidité.....	18
3.2.10.2. Cinétique de croissance bactérienne.....	19
3.2.10.2.1. Technique de spots.....	19
3.2.10.2.2. Densité optique.....	19
3.2.11. Analyse sensorielle.....	20

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Détermination de la concentration en argile.....	21
2. Isolement et purification des souches	22
2.1. Etude morphologiques.....	22
2.1.1. Examen macroscopique.....	22
2.1.2. Examen microscopique.....	23
2.2. Etude biochimique	23
2.2.1. Test de catalase.....	23
2.2.2. Type fermentaire.....	24
3. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne.....	25
3.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques.....	25
3.1.1. pH et l'acidité.....	25
3.2. Cinétique de croissance bactérienne.....	26
3.2.1. Technique de spots et densité optique.....	26
4. Analyse sensorielle	29
Conclusion.....	30
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
المخلص	

Liste des abréviations

- ✓ °D: Degré Dornic
- ✓ DO : Densité optique
- ✓ ENF : Entreprise Nationale des fonderies
- ✓ H₂O₂ : Eau oxygéné
- ✓ Lb : *Lactobacillus*
- ✓ M17 : Milieu de Tarzghi
- ✓ MRS: Man Rogosa Sharp
- ✓ NaOH : Hydroxyde de sodium
- ✓ pH : Potentiel d'hydrogène
- ✓ Str : *Streptococcus*
- ✓ Subsp : Sous espèce
- ✓ trs: Tours
- ✓ UV: Ultrat –violet

Liste des tableaux

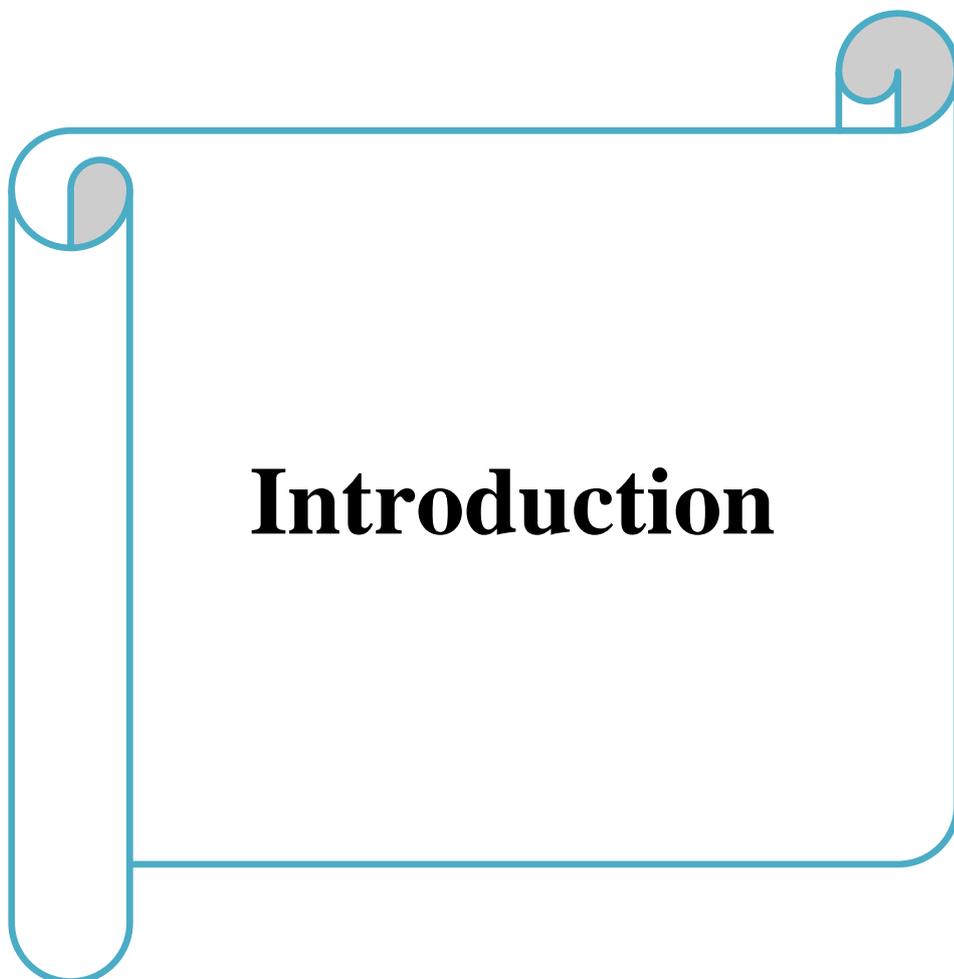
Numéro	Titre des tableaux	pages
01	Composition moyenne de lait de vache	02
02	Classification des bactéries lactiques du yaourt	04
03	Appareillage, verrerie et autre matériel	08
04	Réactifs chimiques, solutions et milieux de cultures	08
05	Concentration de la suspension argileuse	21
06	résultats d'évaluation de l'analyse sensorielle de yaourt ferme préparé.	29
Tableau des annexes		
07	Les valeurs de la variation de pH en fonction de temps	Annexe 08
08	Les valeurs de l'acidité en fonction de temps	Annexe 08
09	les valeurs de nombre de micro-spots en fonction de temps	Annexe 08
10	Les valeurs de la densité optique en fonction de temps	Annexe 08
11	Evaluation de l'analyse sensorielle de yaourt ferme préparé	Annexe 09

Liste des figures

Numéro	Titre des figures	Pages
01	Protocole expérimental	09
02	Les étapes de purification de l'argile	10
03	Détermination de la concentration en argile	11
04	Les étapes de l'isolement des souches	12
05	les étapes d'immobilisation des deux bactéries	15
06	Reconstitution et traitement du lait	16
07	La fabrication de yaourt	17
08	Aspect macroscopique des deux souches sur milieu M17 et MRS Liquide	22
09	Aspect des colonies des deux souches sur milieu M17 et MRS	22
10	Aspect microscopique et arrangement des deux souches après coloration de Gram	23
11	Test de catalase des deux ferments lactiques	24
12	Type fermentaire des deux ferments lactiques	24
13	Cinétique d'évolution de pH et de l'acidité en fonction de temps	25
14	Aspect des colonies sur milieu MRS solide (technique des micro-spots).	26
15	Cinétique de croissance de la culture mixte des souches en fonction de temps.	27

Liste des photos

Numéro	Titre des photos	Annexe
01	Préparation de la suspension d'argile 20g d'argile dans 1L d'eau distillée.	03
02	Récupération de 400ml de surnagent par siphonage.	03
03	Filtration sous vide de la solution argileuse.	03
04	Lait en poudre de marque Candia.	04
05	levains immobilisés	05
06	Technique de spots	06
07	Conservation des deux souches à courte durée	07



Introduction

Introduction

Le lait est un élément essentiel dans notre régime alimentaire, qu'il soit sous forme liquide, transformé ou sous forme cachée dans les préparations alimentaires (**Boubellouta, 2008**). Leur fermentation s'effectue par divers types de bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Dortu et Thonart, 2009**), que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées (**Guetarni, 2018**), elles sont employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (laits fermentés, fromages, yaourts etc.).

Le yaourt est un produit laitier de grande consommation qui possède une grande valeur nutritionnelle (**Hachana et al., 2017**), obtenus par le développement des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (**Bokassa et al., 2011**), ces bactéries sont considérées comme un exemple représentatif pour l'étude de l'influence exercée par les processus d'immobilisation sur la production d'une part et, les propriétés laitières d'autre part car ce groupe de bactéries ainsi l'argile, ont un effet bénéfique sur le tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal (**Ibrahim et al., 2004; Chikhi, 2013**).

L'objectif de notre travail consiste à utiliser l'argile comme un support solide pour immobiliser les bactéries lactiques « *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* » à fin de voir leur effet sur les qualités du yaourt.



Première partie :
Synthèse
bibliographique

1. Lait

1.1. Définition

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en beta carotène. Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne (**Bourgeois et al., 1996**).

Le lait est un mélange liquide de nombreuses substances dont certaines, telles le lactose ou les caséines n'appartiennent qu'à lui... une multitude de constituants qu'on peut néanmoins classer en un petit nombre de catégories comme pour toute autre matière vivante (**Mathieu, 1998**).

Tableau 01 : Composition moyenne du lait de vache (**Mathieu, 1998**).

La composition	Teneures (g/l)
-Eau	902
-Glucides (lactose)	49
-Matières grasses	38
-Protéines(Caséines)	26
Protéines solubles	6
-Sels	9
-Autres substances	1.5

2. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif qui regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus*. Ces bactéries peuvent avoir des formes de bâtonnets ou de coques, sont immobiles et ne sporulent pas. Elles ont également un métabolisme aérobie facultatif et ne produisent pas de catalase.

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique .Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires est produisent de l'acide lactique en même temps que d'autre composés (acétate et éthanol en général) (**Drouault et Corthier, 2001**) Et selon les même auteurs Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers tels que le yaourt.

2.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram+, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase négatives, micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autre hétéro lactiques (Guiraud, 2012).

2.1.1. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus est une bactérie lactique homofermentaire utilisée en co-culture avec *Streptococcus thermophilus* pour la production de yaourts (Guillouard et al., 2004).

D'après Bouhanna (2013), il se développe bien à la température de 45 à 50°C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8% (pH voisin de 4,5), voire 2,7% d'acide lactique (pH 3,8 à 3,6).

2.2. *Streptococcus*

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif non mobiles, appartenant à la famille des *Streptococcaceae* (Savado, 2011). Ce sont des germes anaérobies facultatifs, généralement micro-aérophiles et très exigeants au point de vue nutritionnel. Ils se développent bien à 37°C (Guiraud, 2012).

2.2.1. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Streptococcus thermophilus est une bactérie alimentaire d'importance économique majeure provenant des produits laitiers. Elle est utilisée pour la fabrication de yaourt et de fromage en association avec d'autres bactéries lactiques telles que *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Lactococcus lactis* (Savado, 2011). C'est une bactérie caractérisée par sa température de croissance optimale de 40-45°C, par sa résistance à un chauffage à 63°C pendant 30 minutes et par son inaptitude à croître en présence de 4% de NaCl et à pH 9.6 (Tabak, 2015).

Tableau 02 : Classification des bactéries lactiques du yaourt, selon Bergy's Manuel (Madigan et Martinko, 2007).

<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
Règne: Bacteria	Règne: Bacteria
Division: Firmicutes	Division: Firmicutes
Classe: Bacilli	Classe: Bacilli
Ordre: Lactobacillales	Ordre: Lactobacillales
Famille: Lactobacillaceae	Famille: Streptococcaceae
Genre: <i>Lactobacillus</i>	Genre: <i>Streptococcus</i>
Espèce: <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Espèce: <i>Streptococcus thermophilus</i>
Sous-espèce: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>Bulgaricus</i>	Sous-espèce: <i>Streptococcus salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>

3. Yaourt

3.1. Définition

La dénomination yaourt est réservée au lait fermenté uniquement obtenus par *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* et en matière de viabilité, la norme précise que la somme des microorganismes constituant le levain doit être au moins de 10^7 UFC g⁻¹(Savadogos, 2011).

Tous les produits contenant des ferments ne peuvent se voir attribuer le nom de yaourt mais celui de lait fermenté, ce qui est le cas de la plus part des nouveaux produits dits «produits santé» (Jeantet et al., 2008).

3.2. Types de yaourt

Selon Jeantet et al., (2008) il existe deux types de yaourts classés en fonction de la texture à savoir :

3.2.1. Yaourt fermes, dont la fermentation a lieu en pots : ce sont généralement les yaourt naturels et aromatisés.

3.2.2. Yaourt brassés, dont la fermentation a lieu en cuve avant brassage et conditionnement : c'est le cas des yaourts veloutés naturels ou aux fruits.

La fabrication de ces deux types de yaourts peut être réalisée soit à partir de lait entier, soit à partir de lait partiellement ou totalement écrémé (3,5% ; 1,0% ; 0,0% MG).

4. Argiles

4.1. Définition

Les argiles sont des silicates d'aluminium plus ou moins hydratés, microcristallins, à structure en feuillets (phyllies) (**Duchaufour, 2001**). D'après **François (2016)**, le terme générique «argile» est couramment utilisé pour désigner différentes roches sédimentaires, cristaux, présentant une forte teneur en minéraux.

4.2. Bentonite

D'après **Boussak (2015)**, la bentonite est une argile colloïdale naturelle découverte aux Etats Unis en 1888 à fort Benton dans le Wyoming. Selon leur origine les bentonites présentent des propriétés différentes. Sur le plan minéralogique, la bentonite est un silicate d'alumine hydraté du groupe des montmorillonites qui contient principalement les cations échangeables suivants : calcium, magnésium et potassium. En Algérie la bentonite est produite à partir de plusieurs bassins volcaniques du Tertiaire à l'Ouest de pays, dans la région de Maghnia et de Mostaganem (**Kouloughli, 2007**).

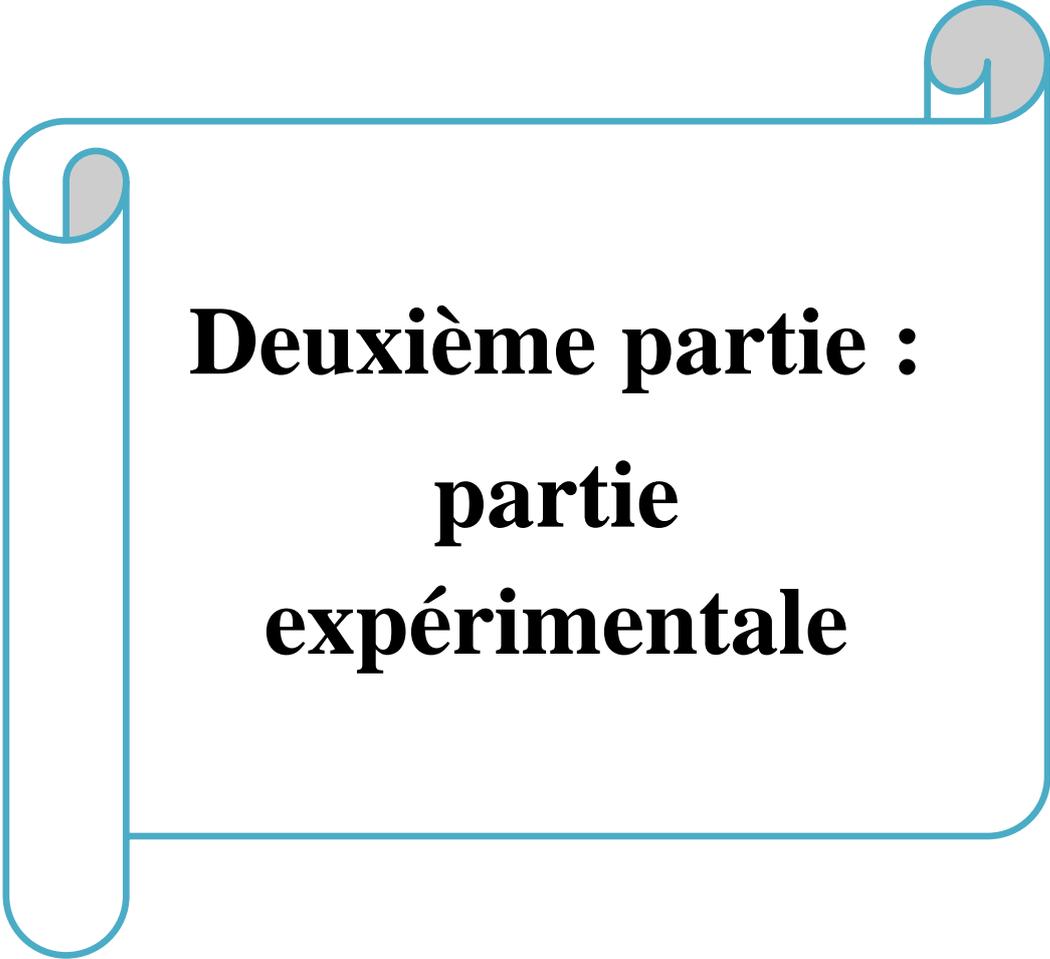
5. Immobilisation cellulaire

L'immobilisation des cellules, consiste à retenir et localiser les cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active, c'est l'un des procédés dans les fermentations laitières pour la production du fromage frais ou du yaourt (**Doleyres, 2003**). La formation d'un biofilm, se fait soit par la liaison covalente, la floculation, l'inclusion, ou rétention par procédés membranaires. Elle peut se faire également d'une manière naturelle par adsorption (**Bourgois et al., 1996**).

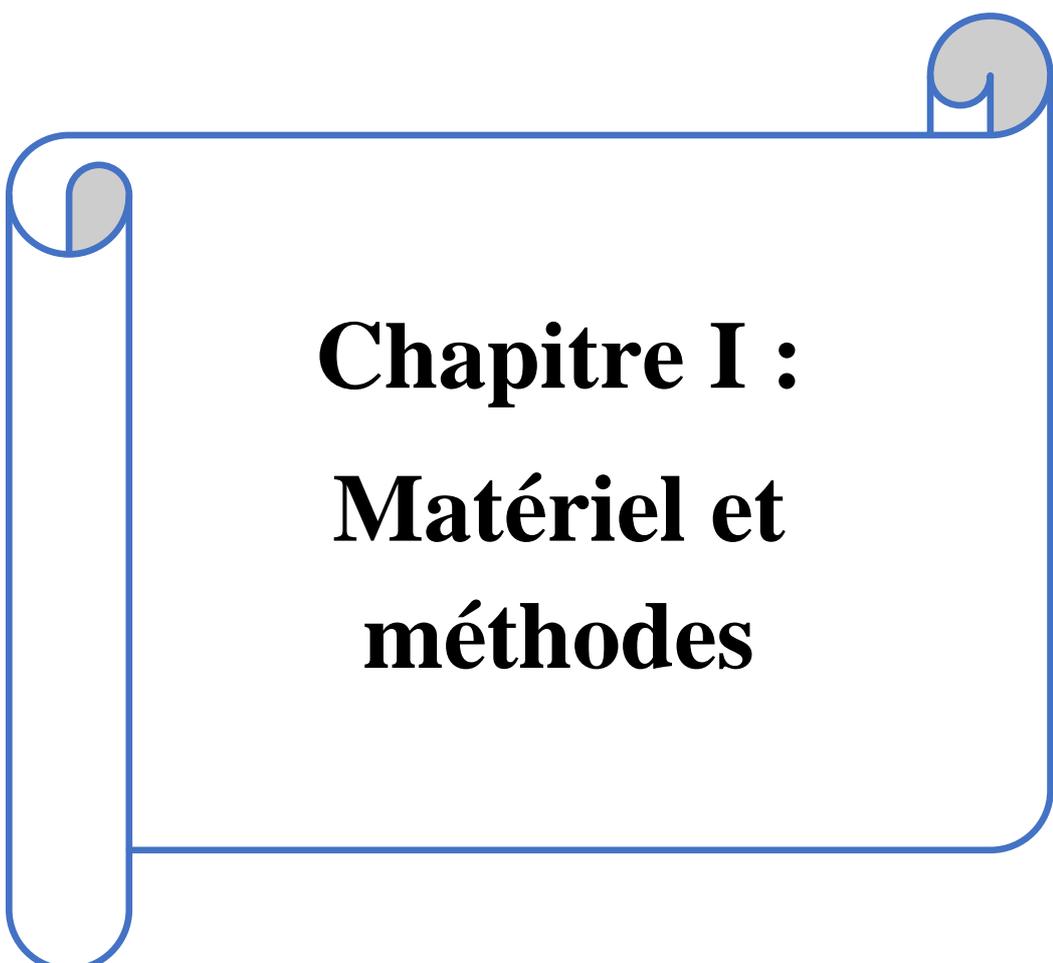
5.1. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption, que ce soit pour les microorganismes ou pour les enzymes, présente une grande simplicité, elle est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces dans des conditions physico-chimiques déterminées. Cette technique

imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développent en biofilms soit sur des supports organiques ou inorganiques (**Bourgeois et al., 1996 ; Doleyres, 2003**).



Deuxième partie :
partie
expérimentale



Chapitre I :
Matériel et
méthodes

1. Objectif du travail

Notre travail vise à utiliser l'argile comme un support solide pour immobiliser les bactéries lactiques de yaourt à fin:

- D'isoler et identifier *Lb.bulgaricus* et *Str.thermophilus* à partir du yaourt.
- D'immobiliser les deux isolats sur un support argileux.
- De voir l'effet de l'immobilisation sur la cinétique des paramètres (pH, acidité, densité optique, croissance bactérienne).et la qualité organoleptique de yaourt ferme.

2. Lieu du travail

Notre travail a été effectué au niveau des laboratoires de microbiologie et de biochimie du département des sciences de la nature et de la vie. Faculté des sciences de la nature et de la vie, et laboratoire d'hygiène et pathologie animal au niveau de l'EX-ITMA, Université d'Ibn khaldoun, Tiaret. Pendant une durée du 10/02/2019 jusqu'au 04 /04/2019.

3. Matériel et méthodes

3.1. Produits et matériel utilisé

3.1.1. Produits

3.1.1.1 Matière première

- **Lait**

Le lait utilisé est un lait entier en poudre vendu dans le commerce sous l'appellation «Candia», contenant 24.5g de protéines et 26g de matière grasse dans 100g de poudre, comme l'indique l'annexe 04

- **Argile**

L'argile utilisée dans notre travail nous a été offerte par l'entreprise de fonderie de Tiaret. Elle provient d'un gisement sis à Maghnia, située à l'ouest de Tlemcen. Elle est utilisée par ENF (Tiffour et al., 2014).

3.1.2. Matériel

Le matériel utilisé dans notre expérimentation est présenté dans les tableaux 03 et 04.

Tableau 03: Appareillage, verreries et autre matériel.

Appareillage	Verreries	Autre matériel
Agitateur magnétique (STUART) Autoclave (SATTDAMPF) Balance analytique (KERN 440-45N) Centrifugeuse (HETTICH) Etuves (MEMMERT) Microscope ordinaire (OPTIKA B-350) Spectrophotomètre UV-VIS (BIOCHROM LIBRA S6) Vortex (WISEMIX) pH-mètre (HANNA INSTRUMENTS HI 2210) Pompe sous vide	Bécher (400 ml, 500 ml, 1000 ml et 2000 ml) Burette graduée (10 ml) Cloches du Durham Capillaire Dessiccateur Eprouvette (500 ml et 1000 ml) Flacons en verre Lames Pipettes Graduées (1 ml, 2 ml et 3 ml) Pipettes pasteur Tubes à essai	Anse de platine Bac de coloration Bain marie (MEMMERT) Bec bunsen Barreau magnétique Distillateur Micropipette (10ul) Pince en bois et en métal Papier filtre

Tableau 04 : Réactifs chimiques, solutions et milieux de cultures.

Réactifs chimique et solution	Milieux de cultures
<ul style="list-style-type: none"> - Alcool (Ethanol 95%) - Bleu de méthylène - Eau distillée - Eau oxygénée H₂O₂ - - Fuchsine - Glycérol - Lugol - Phénolphtaléine - NaOH préparé (0.1 N) - Violet de gentiane 	<ul style="list-style-type: none"> - Lait écrimé voir (annexe 01) - Milieu M17 et Milieu MRS modifié (bouillon et Gélose) voir (annexe01)

3.2. Méthodes

3.2.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental de notre étude est représenté par la figure N°01 :

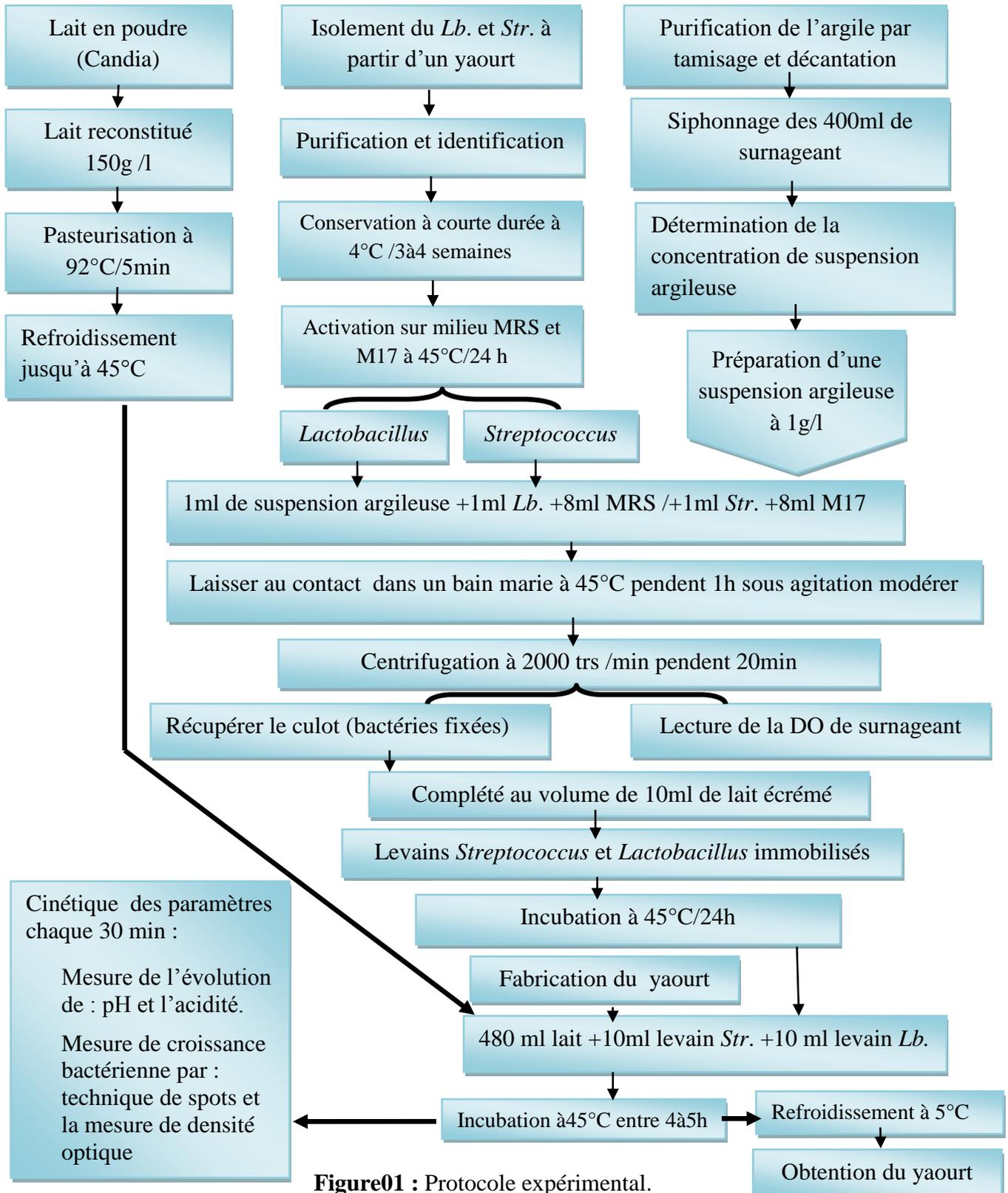


Figure01 : Protocole expérimental.

3.2.2. Préparation de la suspension argileuse

3.2.2.1. Purification de l'argile

La purification de l'argile est faite selon le diagramme suivant:

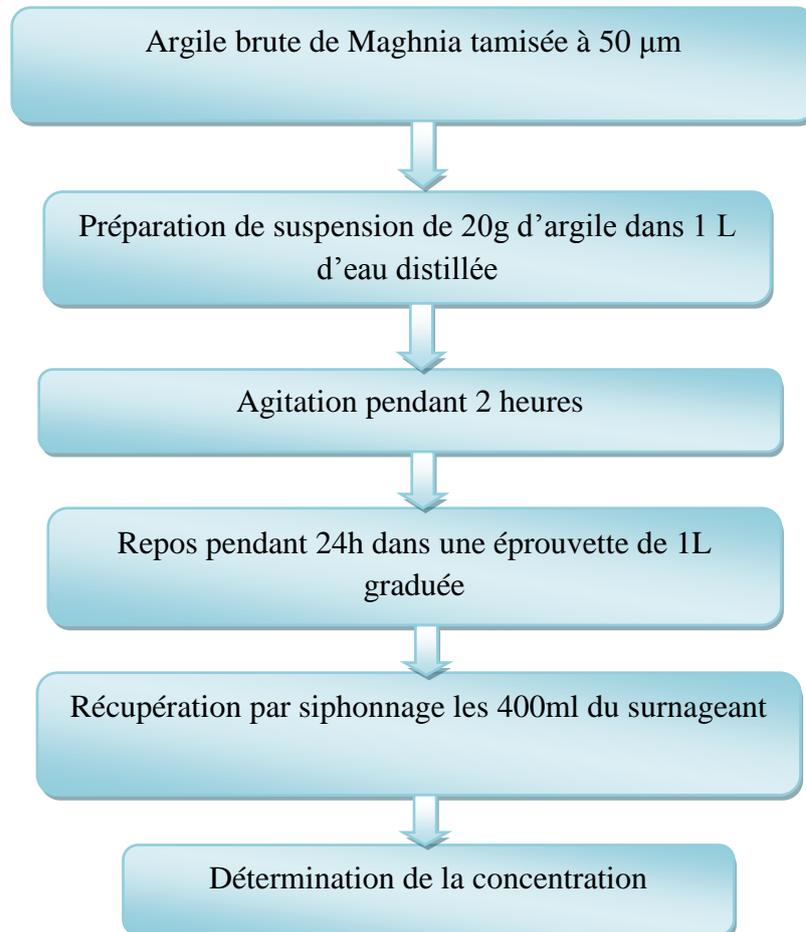


Figure 02: Les étapes de la purification de l'argile.

3.2.2.2. Détermination de la concentration en argile

Le mode opératoire de la détermination de la concentration d'argile est le suit:

- Sécher le papier filtre vide dans une étuve à 105°C jusqu'à la stabilisation du poids soit P_1 le poids du papier filtre vide exprimé en g;
- Prélever un volume V de 50ml qu'on filtre sous vide ;
- Récupérer le papier filtre et le sécher dans une étuve à 105°C jusqu'à la stabilisation du poids soit P_2 le poids du papier filtre avec les particules argileuse exprimé en g ;
- Il faut noter que le papier filtre avant le pesage et met dans un dessiccateur pendant 30min pour le refroidissement a fin d'évité la fixation de l'humidité de l'air.
- Expression de résultats soit C_a la concentration en argile en g/l est calculée selon la relation suivante:

$$C_a = (P_2 - P_1) / V$$

Après la concentration en argile est déterminée, on prépare une solution à 1g/l d'argile selon 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 préparée à 1g/L ;

V_1 : volume à prélever qu'on le cherche ;

V_2 : volume de la suspension préparée 50ml .

3.2.3. Isolement et ré-identification des souches

La figure 04 représente les étapes de l'isolement des souches

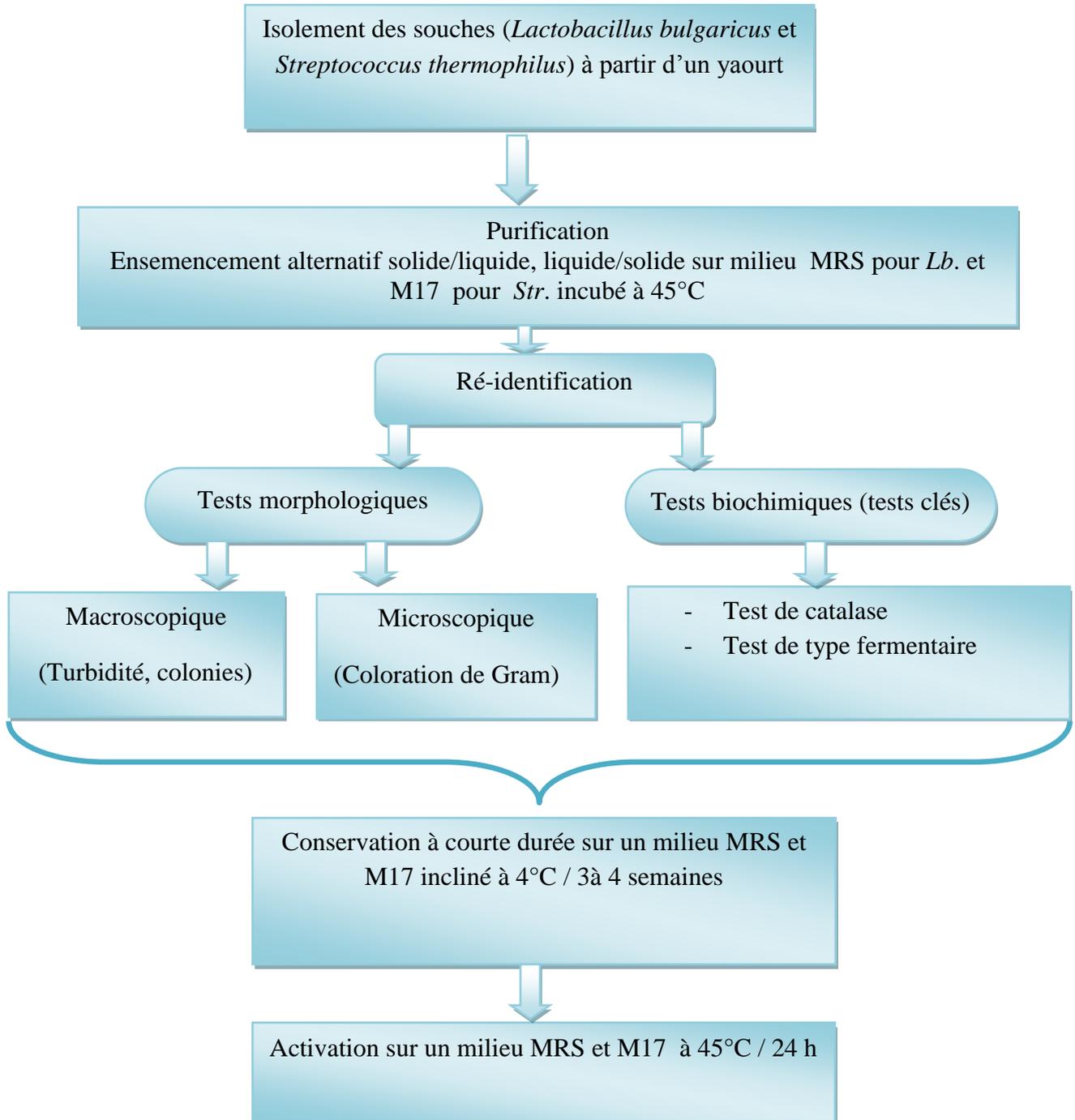


Figure 04 : Les étapes de l'isolement des souches.

3.2.4. Isolement et purification des souches

L'isolement des bactéries a été réalisé à partir des échantillons de deux types de yaourts « Ramdy et SOUMMAM » deux genres de bactéries lactiques ont été isolés *Lb* et *Str*, respectivement sur les milieux MRS modifié et M17, plusieurs repiquage successifs ont été effectués sur milieu solide et liquide jusqu'à l'obtention des souches pures. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de strie suivie d'une observation microscopique (Lairini et al., 2014).

3.2.5. Identification

L'identification des souches purifiées est établie pour les bactéries lactiques en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques (forme, coloration de Gram, test de catalase et type fermentaire). Ensuite pour assurer une bonne continuité de travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates (Lairini et al., 2014).

3.2.6. Etude morphologiques et biochimiques

3.2.6.1. Etude morphologiques

3.2.6.1.1. Examen macroscopiques

Pour les examens macroscopiques des bactéries communes, aérobies strictes et anaérobies facultatives, les souches bactériennes doivent être cultivées sur un milieu gélosé solide en boîte de pétri et dans un milieu liquide en tube, afin de déterminer les caractères culturels de ces bactéries (Delarras, 2007).

3.2.6.1.2. Examen microscopiques

- **Coloration de Gram**

La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, qui permet de diviser les bactéries en deux grandes groupes : Gram+ et Gram- .Celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool sont Gram + : Celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant sont dites Gram- (Guiraud, 2012). Les étapes de la technique de coloration de gram sont présentées dans l'annexe 02.

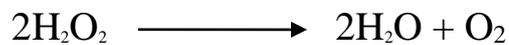
3.2.6.2. Etude biochimique

3.2.6.2.1. Mise en évidence de la catalase

- **Principe**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, elle décompose l'eau d'oxygène qui se dégage. La recherche de cette enzyme est utile pour différencier les bactéries (Delarras, 2007). L'enzyme catalase est un critère biochimique des flores lactiques qui empêche l'accumulation du peroxyde d'hydrogène (Bouziad et al., 2012).

D'après (Joffin, 2006) La réaction catalysée est la suivante :



- **Mode opératoire**

Le test de détection de cette enzyme dans une souche bactérienne, consiste à déposer une goutte d' H_2O_2 sur une lame et ajouter à l'aide de l'anse de platine une colonie prélevée du milieu gélosé. Le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux (O_2), le test catalase permet de distinguer entre les souches qui sont catalase négatives et celle qui sont catalase positives (Bouziad et al., 2012).

3.2.6.2.2. Type fermentaire

- **Principe**

Par définition, l'hétéro fermentation est la capacité des bactéries lactiques à produire des molécules différentes du lactate telles que le CO_2 , l'acétate, l'éthanol...à partir du sucre. Pour distinguer les bactéries lactiques hétérofermentaires des bactéries lactiques homofermentaires qui produisent seulement l'acide lactique.

- **Mode opératoire**

Le repiquage d'une colonie donnée dans un tube de bouillon MRS contenant au préalable une cloche de Durham. Après ensemencement de la colonie, le bouillon est recouvert de paraffine et l'ensemble est mis à incuber à 45°C . Les tubes sont observés

pendant 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble), du décollement de la paraffine, et du dégagement gazeux dans la cloche.

3.2.7. Conservation à courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, Les cultures sont maintenues à 4°C pendant 3 à 4 semaines (Badis et al., 2005).

3.2.8. Fixation des bactéries

L'immobilisation ou la fixation des cellules microbiennes peut être définie comme la localisation des cellules entières dans l'espace en réaction avec conservation de leurs propriétés catalytiques si bien qu'il est possible de les utiliser de façon répétitive et continue (Bourgeois et Larpent, 1989).

• Mode opératoire

- Activer les deux bactéries (*Streptococcus* et *Lactobacillus*) respectivement sur milieux M17 et MRS liquide à 45 °C pendant 24 h ;
- Additionner 1ml de la suspension argileuse à 1g/l au 1 ml de *Streptococcus* et 8 ml de bouillon M17 ;
- Additionner 1ml de la suspension argileuse à 1g/l au 1 ml de *Lactobacillus* et 8 ml de bouillon MRS ;
- Laisser au contact dans un bain marie à 45 °C pendant 1 h sous agitation modérée ;
- La solution ainsi obtenus est centrifugée à 2000 trs/min pendant 20 min ;
- Récupérer le culot (bactéries fixées) ;
- Lire la densité optique du surnageant à 625 nm ;
- Compléter au volume de 10 ml avec le lait écrémé puis incubé à 45 °C pendant 24 h ;
- Obtention des levains de *Streptococcus* et *Lactobacillus* immobilisées.

L'ensemble des étapes sont résumé dans la figure 05 :

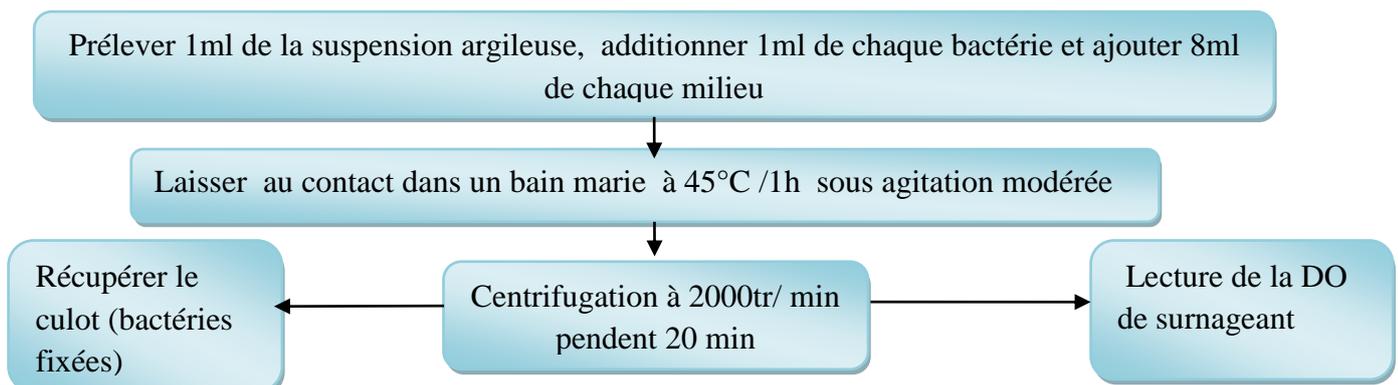


Figure 05 : Les étapes d'immobilisation des deux bactéries.

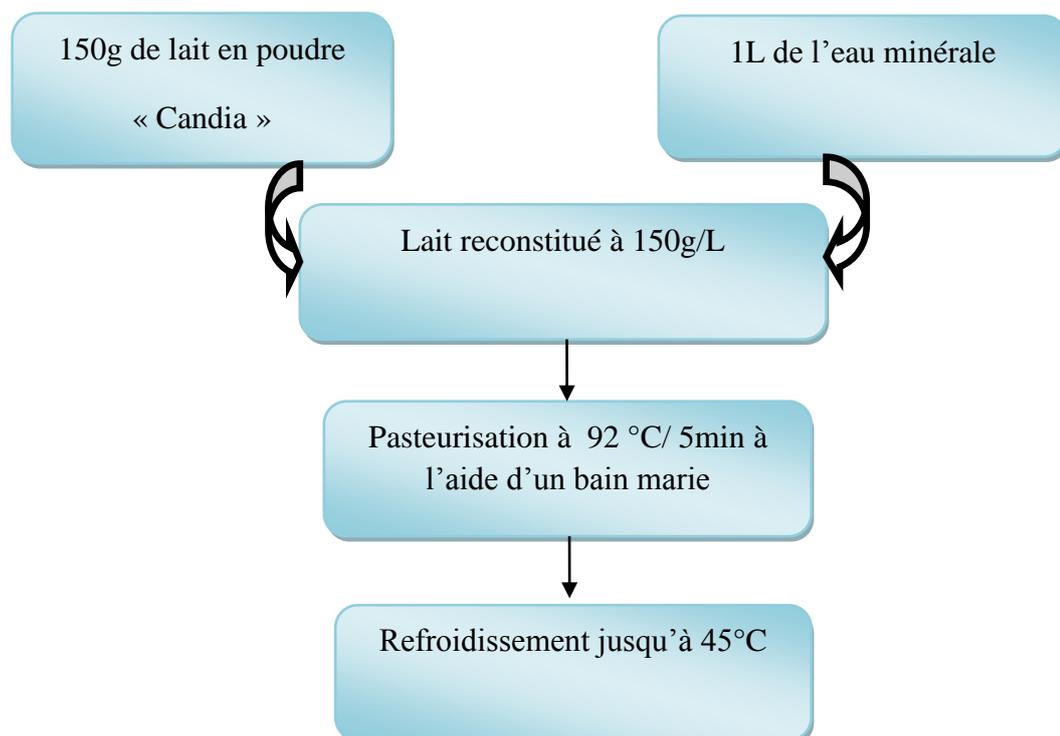
3.2.9. Fabrication de yaourt

Selon **Mahaut et al. (2008)**, les étapes de la fabrication sont résumées comme suit :

3.2.9.1. Reconstitution et traitement du lait

Peser 150g de poudre du lait et les mettre dans un bécher stérile, contenant 1L de l'eau minérale, tout en agitant à l'aide d'un agitateur magnétique, une fois le lait est homogénéisé subit selon **Mahaut et al. (2008)**, une pasteurisation à 92°C pendant 5min puis laisser le refroidir jusqu'à 45°C.

La figure 06 résume les étapes de la préparation du lait utilisé dans notre expérimentation

**Figure 06** : Reconstitution et traitement du lait.

3.2.9.2. Inoculation et incubation

D'après **Larpent. (1997)**, Inoculer 480 ml de lait déjà préparé avec les 10 ml des deux levains de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*, puis il est incubé et met dans un bain marie à 45°C entre 4 à 5h. Bloquer la croissance par un refroidissement à 5 °C, à fin obtenir un yaourt ferme.

Le suivi de la cinétique des paramètres de yaourt a été réalisé chaque 30min.

L'ensemble de ces étapes sont résumés dans la figure 07

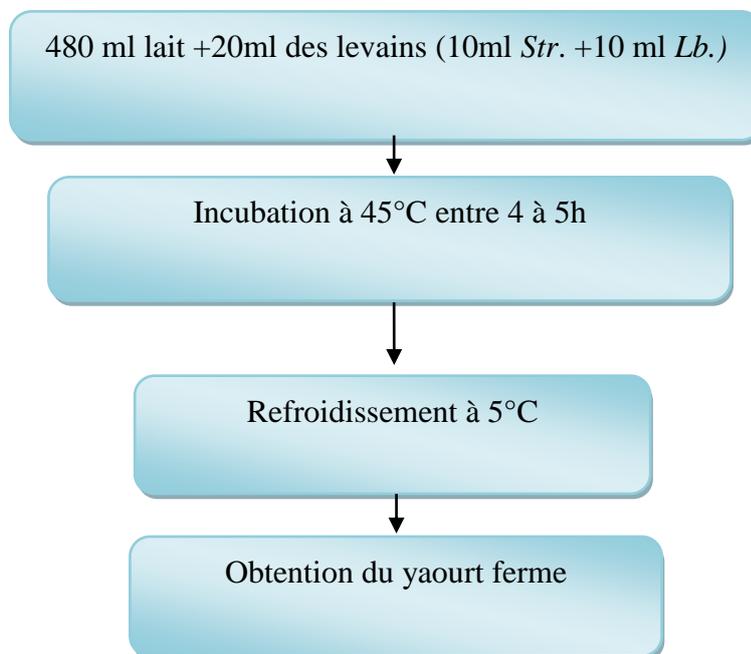


Figure 0 7: les étapes de la fabrication de yaourt.

3.2.10. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne

Chaque 30 min, on suit la cinétique des paramètres physicochimiques et la croissance bactérienne

3.2.10.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques

3.2.10.1.1. pH

- **Principe**

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre numérique avec une électrode en verre. Ces électrodes ont une bonne sélectivité vis-à-vis des protons H⁺. Elles permettent des mesures directes de l'échantillon (Gbassi, 2010).

- **Mode opératoire**

- Etalonner le pH mètre par solution tampon ;
- Prolonger l'électrode de pH-mètre dans le tube de l'échantillon à analyser ;
- Lire la valeur du pH sur l'échelle graduée du pH-mètre.

3.2.10.1.2. Acidité

- **Principe**

L'acidité des laits fermentés est dosée à l'aide d'une solution de NaOH N /9 en présence de phénolphtaléine. Un volume de NaOH est ajouté jusqu'à virage persistant au rose de l'indicateur. Le volume ajouté correspond à l'acidité Dornic produite.

- **Mode opératoire**

Pour déterminer L'acidité remplir la burette par la solution de NaOH déjà préparé (0.1 N). Régler le niveau du liquide à zéro. Puis ajouter quelques gouttes de solution de phénolphtaléine dans 10 ml de l'échantillon à analyser et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisée.

Les résultats sont exprimés selon la relation:

$$\text{Acidité} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

L'acidité est exprimée en degré Dornic où $1^{\circ}\text{D}=0.1\text{g/l}$ d'acide lactique.

3.2.10.2. Cinétique de croissance bactérienne

La détermination de croissance bactérienne se fait par deux méthodes :

3.2.10.2.1. Technique de spots

Le dénombrement est une technique permettant de quantifier à l'œil le nombre d'unités formant colonies (UFC). On effectue des dilutions successives au dixième dans l'eau distillée et on dépose $10\mu\text{l}$ 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**).

D'après **Guiraud (2012)**, les résultats sont exprimés selon la relation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(\mathbf{n1} + 0.1\mathbf{n2})\mathbf{d}}$$

N : est le nombre des colonies exprimées en UFC/ml.

$\sum C$: est la somme des colonies comptées sur les boîtes.

n₁ : est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus faible.

n₂ : est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus élevée.

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

3.2.10. 2.2. Densité optique

- **Principe**

Le suivi de la croissance de *Streptococcus* et *Lactobacillus* se fait par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 625nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS.

Lorsqu'une suspension cellulaire dans un milieu liquide est traversée par un faisceau lumineux monochromatique, elle absorbe une quantité de lumière qui est proportionnelle à sa concentration cellulaire selon la loi de Beer Lambert (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

- **Mode opératoire**

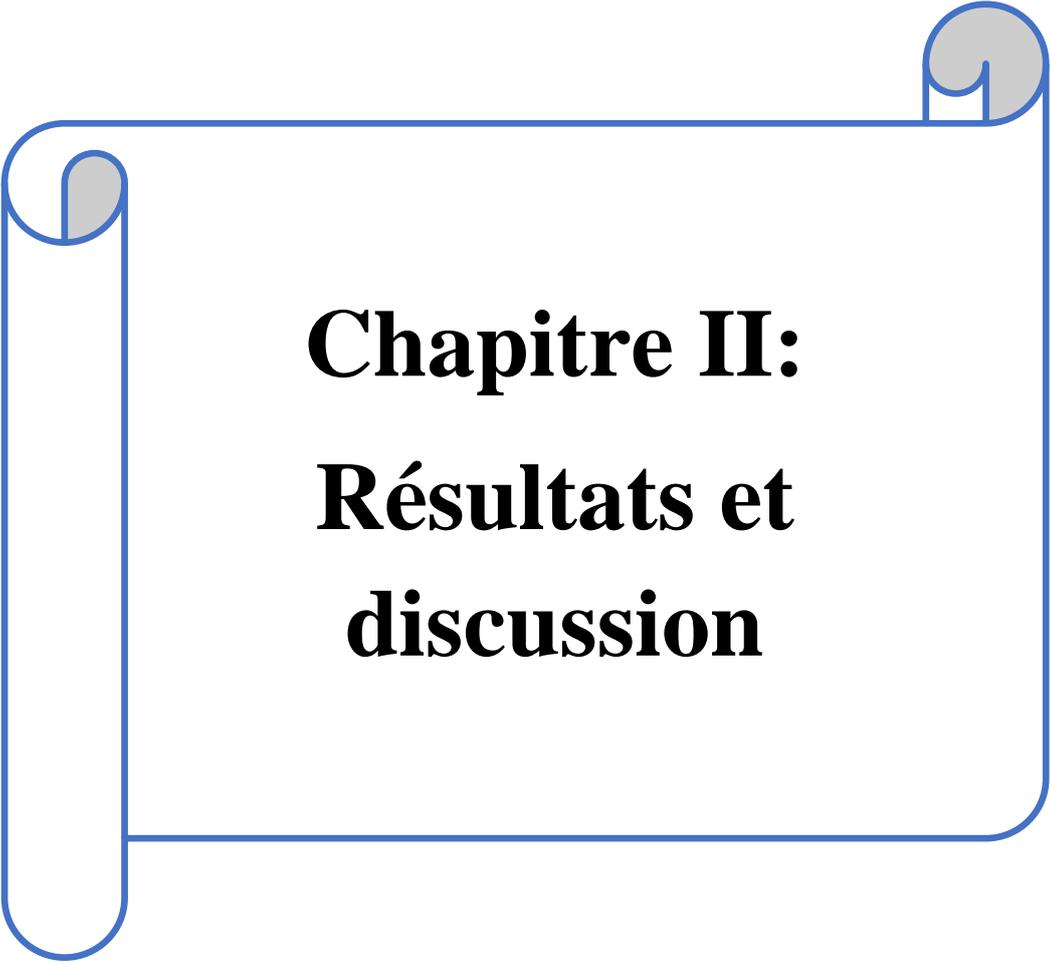
- Faire des séries de dilutions décimales de l'échantillon à analyser dans l'eau distillée ;
- Régler l'appareil à la longueur d'onde 625 nm ;
- Remplir la cuve avec le blanc puis la placer dans le logement ;
- Régler l'appareil de sorte que l'absorbance indiquée soit égale à zéro ;
- Sortir la cuve, la vider et la rincer avec la solution à analyser ;
- Lire l'absorbance de la solution à analyser ;
- Vider et nettoyer la cuve.

3.2.11. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est un ensemble des méthodes permettant de mesurer les perceptions sensorielles, elle est basée essentiellement sur les sensations de l'homme (vue, ouïe, odorat, gout, toucher) (**Chakirou et Rebouh, 2018**).

Ce test a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit, d'après **Moulay (2014)**, l'acceptation d'un produit alimentaire indique en général la consommation réelle de ce produit.

Les évaluations sensorielles de yaourt fabriqué sont réalisées au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie Université de Ibn-khaldoun Tiaret, par un jury de dégustateurs composés des enseignants, des étudiants et de techniciens de laboratoire.



**Chapitre II:
Résultats et
discussion**

Résultats et discussion

1. Détermination de la Concentration en argile

Le tableau 05 donne la valeur de concentration en argile de la suspension siphonnée.

Tableau 05: Concentration de la suspension argileuse

Les pesées	Le poids du papier filtre séché en (g)	
	Avant filtration Papier filtre vide P ₁	Après filtration Papier filtre avec les particules argileuses P ₂
Pesée 1	1.2789	2.1499
Pesée 2	1.2767	2.1489
Pesée3	1.2760	2.1486
Poids stables Ps	1.2760	2.1486
Différence des poids stables (P ₂ -P ₁)	0.8726g	

La détermination de la concentration en argile est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$C_a = (P_2 - P_1) / V$$

$$\text{Ou } V = 50 \text{ ml} = 50 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$C_a = 0.8726 \text{ g} / 50 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$C_a = 17.45 \text{ g/L}$$

La valeur trouvée de la concentration en argile de la suspension siphonnée est égale 17,45 g/L, cette valeur est légèrement supérieure à celle trouvée par **Bouakka et al. (2016)**, qui ont trouvé une valeur de 17 g/L.

2. Isolement et purification des souches

2.1. Etude morphologiques

2.1.1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique de développement des deux souches sur les milieux M17 et MRS liquides, montre un trouble dans les tubes en profondeur où la pression d'O₂ est faible (figure 08).

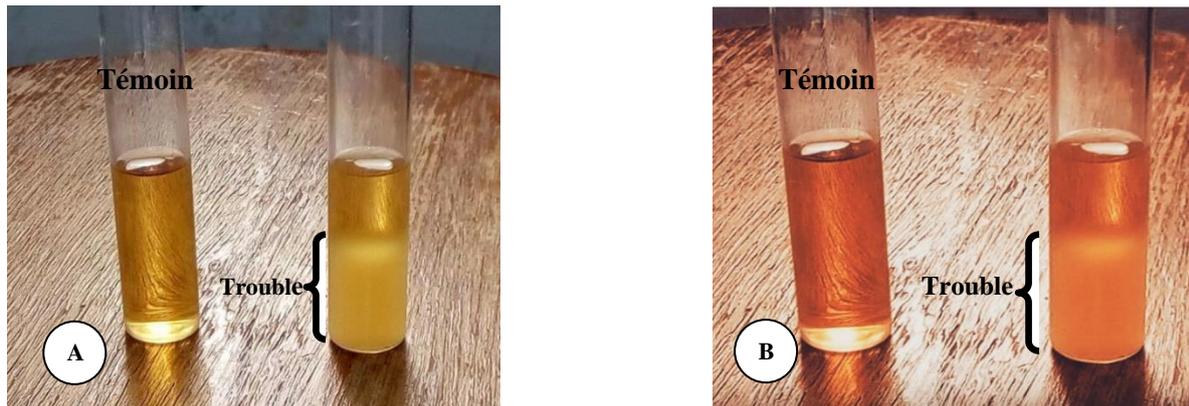


Figure 08 : Aspect macroscopique des deux souches sur milieu M17 et MRS Liquide.

A: *Streptococcus thermophilus* à 45°C /24h.

B: *Lactobacillus bulgaricus* à 45°C /72h.

Sur milieu solide, les colonies obtenues sur gélose sont circulaires de petites tailles, blanchâtres ou légèrement jaunâtres (figure 09).



Figure 09 : Aspect des colonies des deux souches sur milieu M17 et MRS solide.

A: *Streptococcus thermophilus* à 45°C / 24h.

B : *Lactobacillus bulgaricus* à 45°C/ 72h.

2.1.2. Examen microscopique

• Coloration de Gram

Après coloration de Gram, les observations microscopiques révèlent que toutes les bactéries retiennent la couleur violette, elles ont permis de déterminer la forme et le mode de regroupement des isolats (figure 10) :

- *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* : des coques disposées en paires ou surtout en chainettes.
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* : des bâtonnets courts isolés, en paires ou en chainettes.

Nos résultats concordent avec les caractéristiques de ces deux souches rapportées par les auteurs **Badis et al. (2005)**.

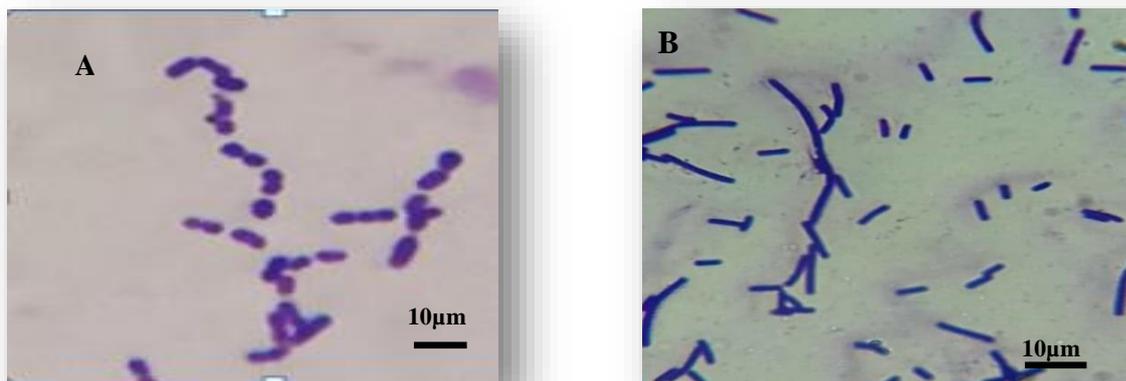


Figure 10 : Aspect microscopique des deux souches après coloration de Gram.

A: *Streptococcus thermophilus*.

B: *Lactobacillus bulgaricus*.

2.2. Etude biochimique

2.2.1. Test de catalase

Nos résultats indiquent une réaction négative (absence de dégagement de bulles) ce qui signifie que les souches étudiées sont à catalase négative (figure 11)



Figure 11 : Test de catalase des deux ferments lactiques.

A : *Streptococcus thermophilus*

B : *Lactobacillus bulgaricus*

D'après **Doleys (2004)**, Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leurs êtres néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le H_2O_2 doit être éliminé par ce que son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination du H_2O_2 est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes.

2.2.2. Type fermentaire

L'utilisation de cloches de Durham dans un milieu liquide contenant du glucose est une méthode pour la détection de la formation de gaz, et déduire ainsi le type fermentaire (figure 12)

Ce test a montré que les deux souches sont incapables de produire du gaz dans la cloche, indique un métabolisme homofermentaire (**Kihal et al., 1996**).

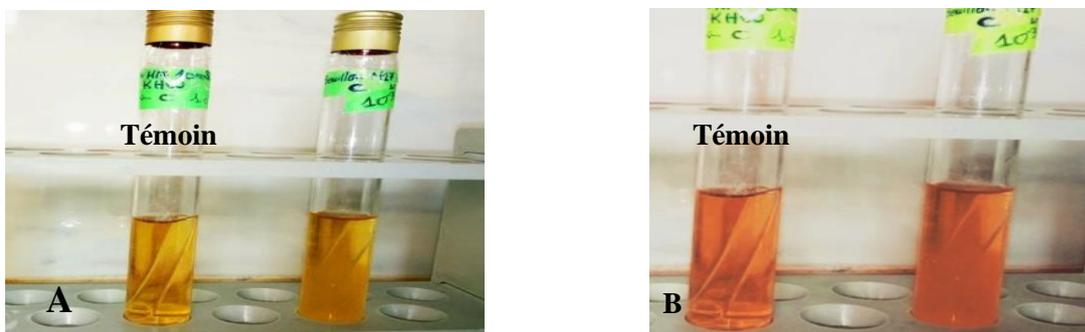


Figure 12 : Type fermentaire des deux ferments lactiques.

A : *Streptococcus thermophilus*.

B : *Lactobacillus bulgaricus*.

3. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne

3.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques

3.1.1. pH et l'acidité

La variation de pH et de l'acidité titrable des échantillons durant la fermentation ont permis d'obtenir les résultats consignés dans la figure 13.

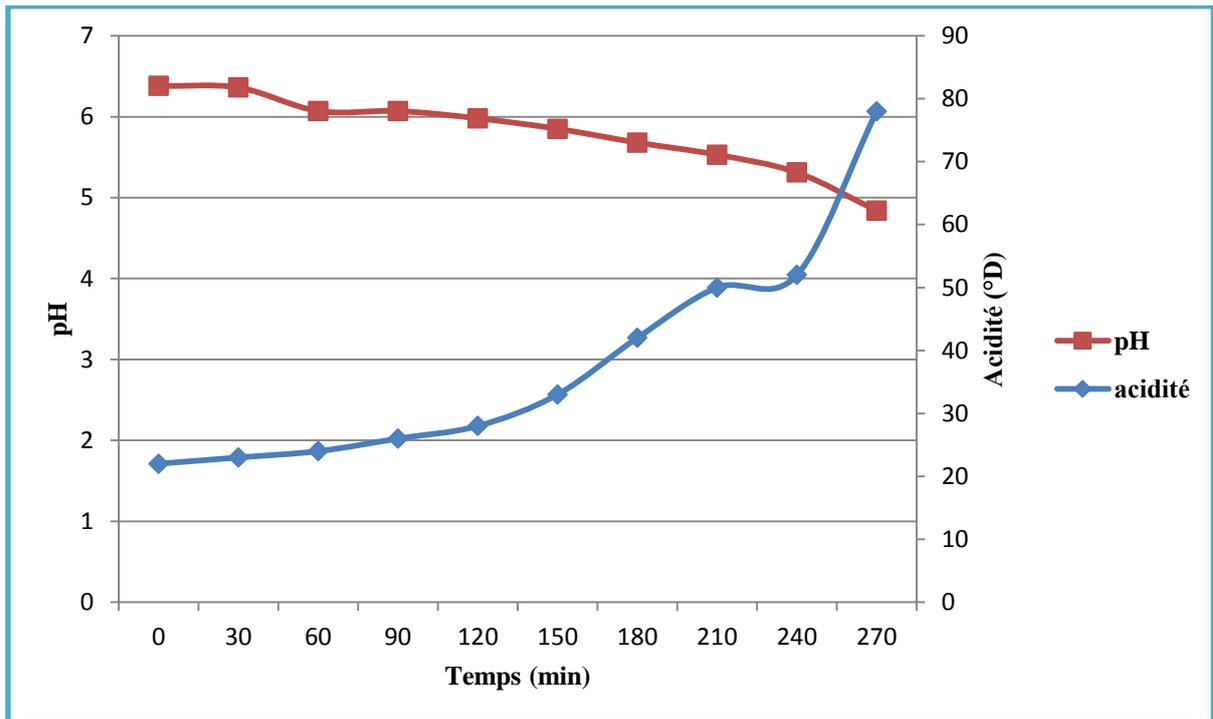


Figure 13 : variation de pH et de l'acidité en fonction de temps.

D'après la représentation graphique obtenue, nous constatons que la valeur du pH diminue tandis que l'acidité augmente durant 270 min d'incubation.

La valeur initiale de pH égale à 6.38 qui correspond à une valeur d'acidité de 22°D, cette valeur est légèrement inférieure à celle signalées par **Boukossa et al. (2011)**, qui ont trouvé une valeur de pH=6.6. Les valeurs sont diminuées progressivement jusqu'à 4.84, ce résultat obtenu est conforme aux résultats donnés par **Hachana et al. (2017)**, qui est égale à 4.8 suivi d'une augmentation très remarquable d'acidité durant la période allant de 2 à 4h et plus rapide à la fin d'incubation qui atteint 78°D. Cette valeur est comprise dans l'intervalle donnée par **Mahaut et al. (2008)**, soit 70 à 80 °D pour les yaourts fermes.

L'observation de l'allure des deux courbes on constate qu'il y'a une relation inversement proportionnelle entre le pH et l'acidité qui d  te à l'accumulation de l'acide lactique produit par l'activité des bactéries lactiques présent dans le milieu. Cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche de lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Ibelhouen, 2015 ; Attik et Benseghir, 2017).

D'après **Bouhanna (2014)**, tous les ferments lactiques possèdent un pouvoir acidifiant plus ou moins prononcé qui se traduit par l'abaissement du pH et l'augmentation de l'acidité.

3.2. Cinétique de croissance bactérienne

A fin de confirmer le suivi de la croissance bactérienne, nous avons adoptés deux techniques : la densité optique et micro-spots.

3.2.1. Technique de spots et densité optique

Les résultats obtenus du dénombrement bactérien et la mesure de la densité optique en fonction de temps sont exprimés dans les figures 14 et 15.

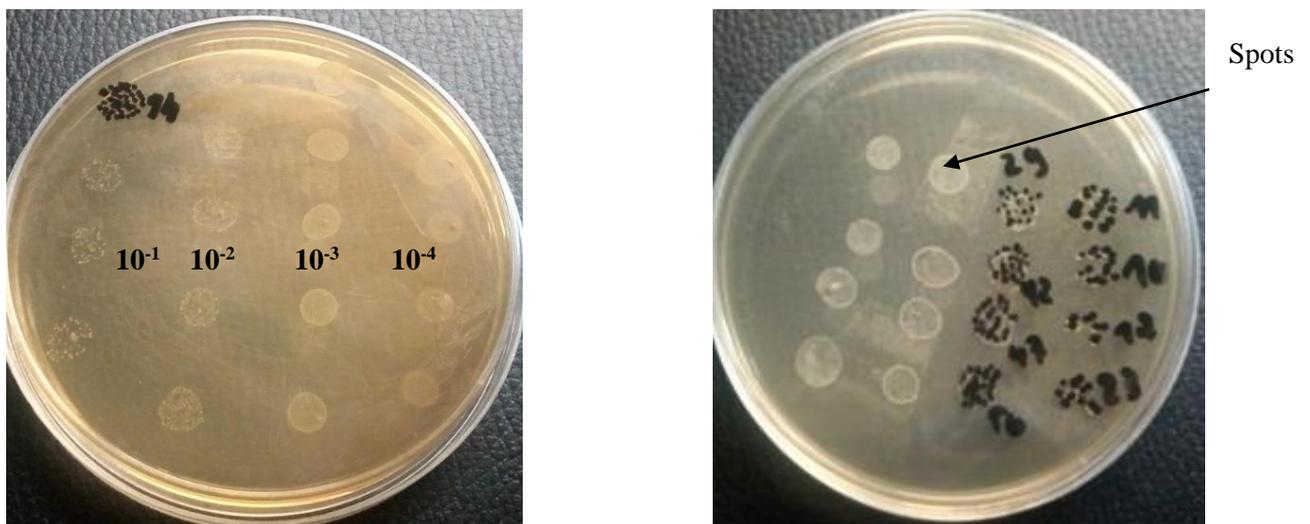


Figure 14 : Aspect des colonies sur milieu MRS solide (technique des micro-spots).

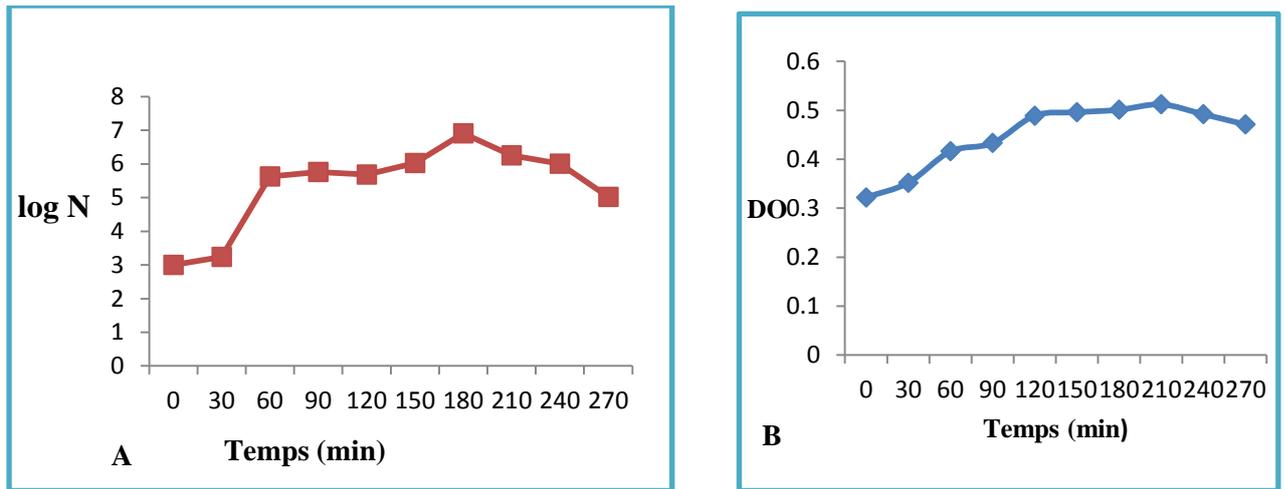


Figure 15 : Cinétique de croissance de la culture mixte des souches en fonction de temps.

A : Technique de micro-spots **B :** Densité optique

D'après les courbes de la figure 15, nous constatons une évolution de la croissance des deux souches immobilisées (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) durant 4h30 d'incubation à 45°C.

Le suivi de la culture de ces souches sur le milieu nous a permis de distinguer les deux phases. On remarque l'absence de la phase de latence au début de la fermentation exprimée par une adaptation préalable dans le milieu, nos résultats sont conformes aux études présentées par **Berkan et al. (2014)**, sur une culture mixte non immobilisées, en suite nous constatons une vitesse de croissance qui augmente légèrement se traduit par une phase de développement exponentielle qui dure environ 210 min avec une $DO=0.51$, cette évolution pourrait être expliquée par les conditions favorables de croissance de ces bactéries tel que la présence de substrat de fermentation (lactose) et le pH adéquat (**Charif, 2018**), cette phase suivie par un ralentissement de la croissance jusqu'à la fin d'incubation. Dans ce cas, les cellules entrent dans la phase déclin.

On outre, on remarque que les deux levains immobilisés donnent un temps de coagulation d'environ 4h30 cette durée est supérieure à celle mentionnée par **Dilmi Bouras et Sadoun. (2001)** soit 2 à 3h pour les cellules libres. Ces différences sont dues à la structure et à l'organisation cellulaire dans le biofilm qui va permettre de modérer les effets des changements des conditions environnementaux (**Meziane, 2008**).

Dans les laits fermentés, particulièrement, les yaourts, la cinétique d'acidification de lait permet de mettre en évidence la synergie existant entre les deux espèces lactiques (**Desmazeaud, 1991**) qui porte sur une stimulation mutuelle. Cette stimulation porte principalement sur la croissance, l'acidification et la production de composés aromatique dont l'acétaldéhyde qui à un rôle prépondérant dans l'arome du yaourt et qui est principalement produit par *Lb.bulgaricus*.

St.thermophilus est stimulé par l'apport d'acides aminés et de petits peptides provenant de l'activité protéolytique de *Lb.bulgaricus*. La stimulation de *Lb.bulgaricus* est attribuée à l'acide formique, à l'acide pyruvique et au dioxyde de carbone produits par *Str.thermophilus* (**Jeantet et al., 2008**).

4. Analyse sensorielle

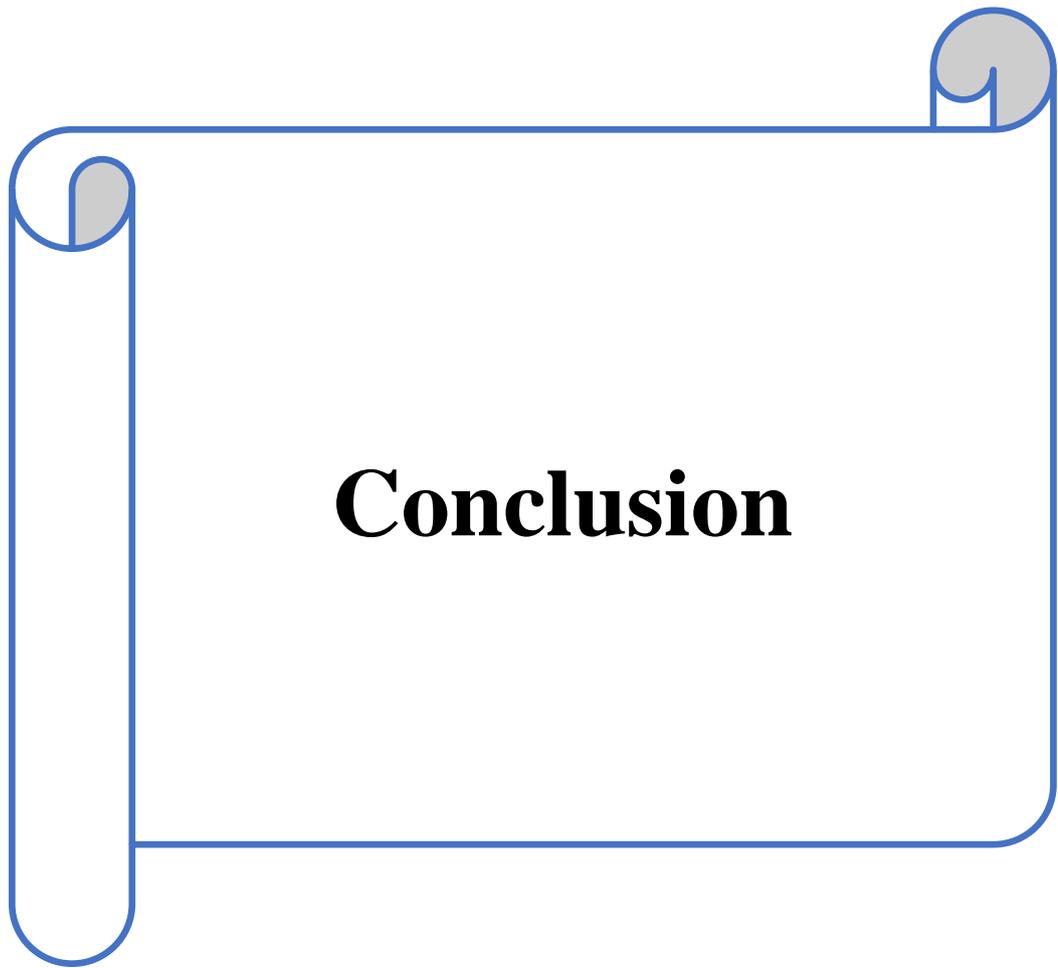
Pour évaluer la qualité organoleptique du produit, un test de dégustation a été réalisé sur le yaourt obtenu, les résultats sont illustrés dans le tableau 6 :

Tableau 06 : résultats d'évaluation de l'analyse sensorielle de yaourt ferme préparé

Caractère sensorielle	Appréciations	% D'évaluation	
Couleur	Jaunâtre	0%	
	Crème	20%	
	Blanchâtre	80%	
Aspect	Sec	0%	
	Hydratant	0%	
	Normal	100%	
Texture	Ferme	90%	
	Granulée	0%	
	Souple	0%	
	Lisse	10%	
Gout	Très bon	0%	
	Bon	80%	
	Moyen	20%	
		Acide	20%
		Amère	0%
		Rance	0%
		Salé	0%
Odeur	Lait cru	0%	
	Yaourt	100%	
	L'ben	0%	
Appréciation globale	Le yaourt est Très bon	10%	
	Le yaourt est bon	90%	
	Le yaourt est acceptable	0%	

Selon les appréciations obtenues, la majorité des dégustateurs (80%) estiment que notre yaourt est d'une couleur blanchâtre, contre (20%) estimant que le yaourt est d'une couleur crème. L'aspect a été jugé à 100% normal, quant à la texture, (90%) ont jugé que la texture ferme. Pour le gout, la majorité des dégustateurs (90%) ont apprécié le yaourt comme bon.

D'après ces résultats, on constate que le yaourt fabriqué à partir des souches immobilisées donne une qualité satisfaisante par rapport à celle trouvée par (**Lazouni et al., 2017**) qui ont obtenu un yaourt avec un gout acide à partir des souches libre.



Conclusion

Conclusion

L'un des intérêts de recherche sur les bactéries lactique est d'améliorer leur performance pour augmenter leurs productivités en raison de leurs caractères technologiques, nutritionnels et éventuellement thérapeutique.

Les bactéries lactiques jouent un rôle central dans la transformation du lait dont leur fermentation confère les propriétés organoleptique et théologiques particulières aux produits laitiers fermentés tel que le yaourt.

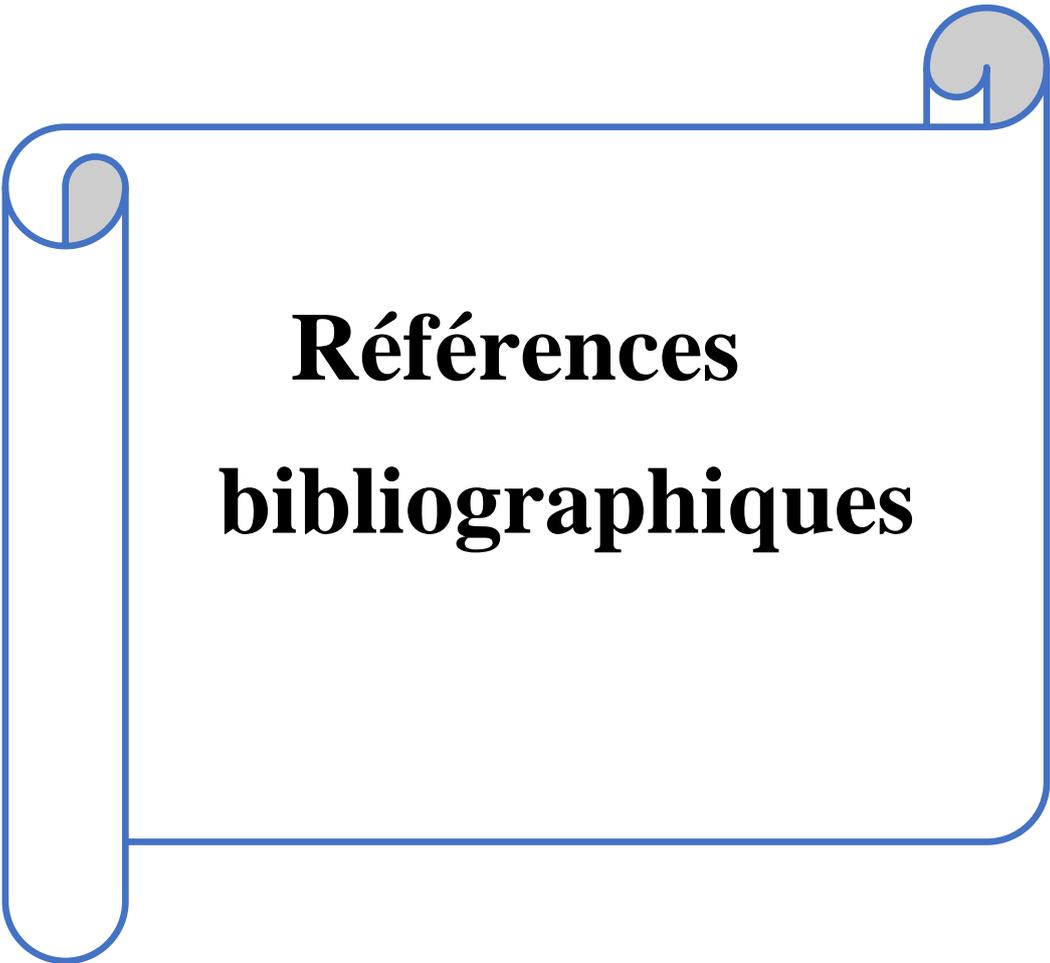
Dans le cadre de notre travail, deux souches de bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) ont été isolée à partir de deux types de yaourt : SOUMMAM et Ramdy et les immobilisées par un support argileux (Bentonite de Maghnia) pour la fabrication d'un yaourt ferme.

Les examens macroscopiques et microscopiques montrent que les streptocoques forment des petites colonies, blanchâtres, lenticulaires, sphériques alors que les colonies de lactobacilles apparaissent blanchâtres, rondes sous forme de bâtonnets, elles sont des Gram positif disposées en paires ou en courtes chainettes, catalase négatif et homofermentaires.

L'étude de la cinétique de croissance et d'acidification montre que l'acidité Dornic qui varie de 22 jusqu'à 78°D augmente proportionnellement avec le nombre des bactéries, alors que le pH qui a diminué de 6,38 jusqu'à 4,8 est inversement proportionnel à l'évolution du nombre des bactéries.

La majorité des dégustateurs estiment que le yaourt fabriqué caractérisé par un aspect normal, une couleur blanchâtre, une texture lisse, un gout bon et une odeur de yaourt.

A la lumière des résultats obtenus, notre étude a atteint l'objectif principal qui est, l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées sur support argileux permet de produire un yaourt de bonne qualité. Néanmoins, des études plus approfondies doivent être réalisées afin de vérifier les résultats obtenus concernant la possibilité d'appliquer cette technologie dans l'industrie laitier.



**Références
bibliographiques**

-A-

- ❖ **Attik W et Benseghir F. (2017).** Suivi de la flore lactique d'un yaourt étuvé aromatisé au niveau de la laiterie « Ramdy » lors de la conservation à 6°C et à 22°C. Mémoire de Master. Université Amira-Bejaia. p 18.

-B-

- ❖ **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetami D., Kihal M et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines local *Arabia et Kabyle*Sciences & Technologie C23. Pp 30-37.
- ❖ **Boubellouta T. (2008).** Apports des spectroscopies infrarouges et de fluorescence couplée à la chimiométrie pour la caractérisation de la structure de matrices fromagères et des relations structure texture. Thèse de Doctorat .Université Blaise Pascal, France. p 19.
- ❖ **Bouhanna I. (2014).** Les ferments locaux et leurs applications en technologie laitière. Mémoire de Magister. Université de Constantine 1. Pp 3-4.
- ❖ **Boussak H. (2015).** Effet de la température sur les performances des céramiques contenant la bentonite de Maghnia. Thèse de Doctorat. Université M'hamed Bougara-Boumerdes. p 21.
- ❖ **Bourgeois C.M., Mescele J.F et Zucca J. (1996).** Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. TEC & DOC LAVOISIER. Paris. p 272.
- ❖ **Bulard F. (2012).** L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Thèse de Doctorat. Université Paris-sud, Paris. p 185.

-C-

- ❖ **Chakirou T et Rebouhd A. (2018).** Essai de formulation d'un produit laitier (yaourt étuvé) au gingembre (Zingiber officinale). Mémoire de Master. Université Abderrahmane MIR-Bejaia. p 22.

Références bibliographiques

~~-D-~~

- ❖ **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. Pp 128-271.
- ❖ **Doleyres Y. (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de Doctorat. Université Laval. p 15.
- ❖ **Dortu C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2009 13(1) ,143-154.p 143.
- ❖ **Drouault S et Corthier G. (2001).** Effet des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Veterinary Research. 32(2001). Pp 102-103.
- ❖ **Dilmi-Bouras A et Sadoun D. (2001).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. Lait 82 (2002) 247-253. p 248.

~~-E-~~

- ❖ **François H. (2016).** L'argile, son utilisation a l'officine. Thèse de Doctorat. Université Angers. p 11.

~~-G-~~

- ❖ **Guetarni H. (2018).** Les probiotiques et leur métabolites : une alternative de traitement des pathologies gastro-intestinales. Systèmes Agricoles et Environnement Vol 02, No 02, p 11-22 .p 11.
- ❖ **Guiraud J.P. (2012).** Microbiologie alimentaire .Dunod. Paris. p 91.
- ❖ **Guillouard I., Lim E-M., Van De Guchte M., Grimaldi C., Penaud S et Maguin E. (2004).** Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Lait 84(2004). p 02.

~~-H-~~

- ❖ **Hachana Y., Rejeb R., Chiboub N et Zneidia. (2017).** Etude des facteurs de variation de la qualité du yaourt Durant le processus de production. Journal of new sciences Volume 41(7). p 2243.

Références bibliographiques

-I-

- ❖ **Ibrahim M., Briandet R., Mistou M.Y., Chrétien A., Tremblay J et Kulakauskas S. (2004).** Immobilisation des lactocoques. Lait 84. p 106.

-J-

- ❖ **Jeantet R., Croguennec T., Mohaut M., Schuck P et Brulé G. (2008).** Les produits laitiers. 2^{ème} édition TEC & DOC LAVOISIER .Paris . p 24.
- ❖ **Joffin C et Joffin J.N. (2010).** Microbiologie alimentaire. 6^{ème} édition SCEREN (CNDP-CRDP).p 344.

-K-

- ❖ **Kouloughlis K. (2007).** Etude expérimentale des mélanges sable bentonite -Leurs performance comme barrière de confinement dans les CET. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. p 76.

-L-

- ❖ **Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., Belkhou R et Zerrouk F. (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche de Kéfir. Afrique science 10 (4).p 269.
- ❖ **Lazouni Hamadi A., Bendimred M et Meslif F. (2007).** Evolution de la qualité physico-chimique, organoleptique d'un yaourt Nature et Mix fabriqué au niveau de la
- ❖ **laiterie SARL HALIB NADJAH, Maghnia ; Mémoire de Master. Université Abou Bekr belkaid Tlemcen. p 39.**

-M-

- ❖ **Madigan M et Martinko J. (2007).** Biologie des microorganismes (Brock). 11^{ème} Ed : Pearson éducation, France .p 1019.
- ❖ **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. TEC & DOC. Paris .p 220.
- ❖ **Moulay M. (2014).** Contribution à l'étude et la caractérisation des lactocoques indigènes isolés du lait cru de chèvre et les produits laitiers Algériens. Thèse de Doctoret. Université d'Oran. p 138.

Références bibliographiques

- ❖ **Meziane M. (2008).** Production en continu de l'acide lactique et du diacétyle par *Lctococcus lactis* ssp immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe Mémoire de Magister. Université Hassiba Ben Bouali Chlef. p 102.

-T-

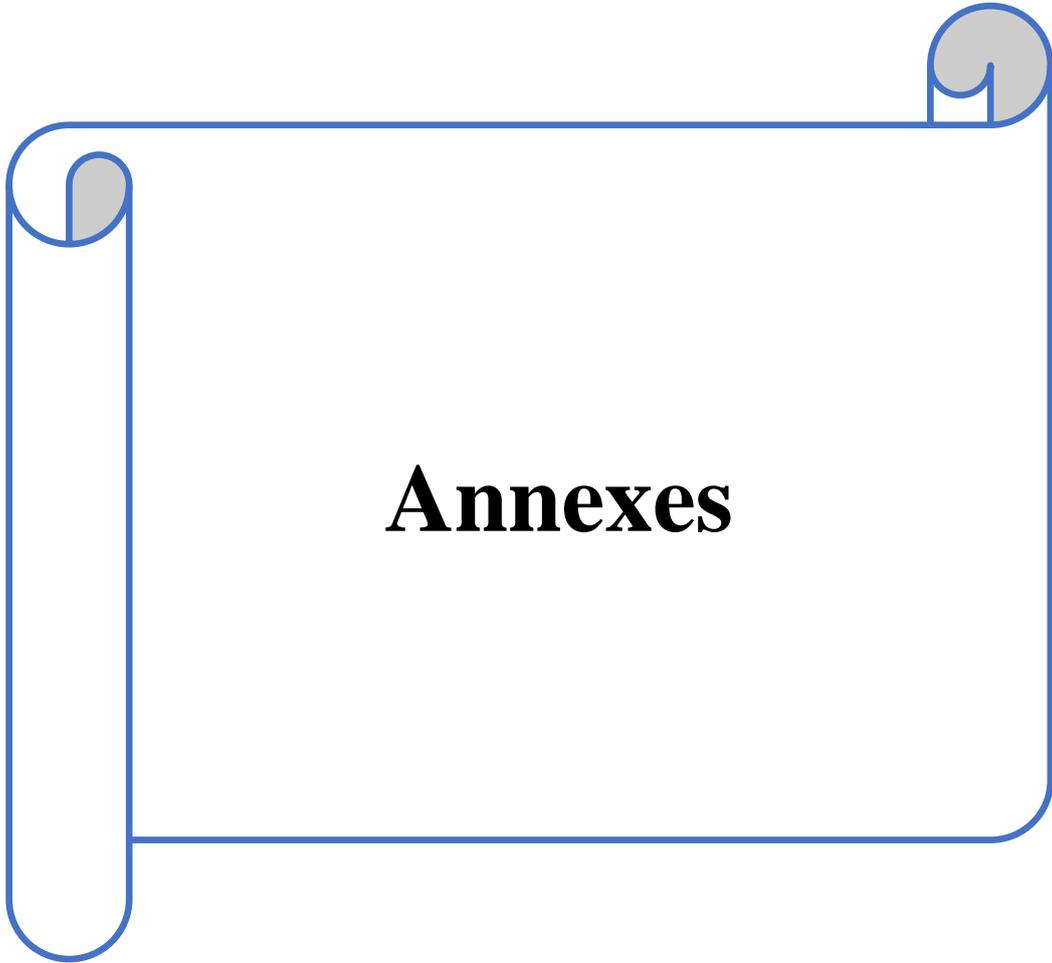
- ❖ **Tabak S et Bensoltane A. (2011).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Revue « Nature & Technologie » n°06-Janvier 2012. P71.
- ❖ **Tiffour H., Cheikh S et Karfas F. (2014).** Effet de complexe argile de Maghnia / bacteria lactique (*Lactococcus diacetylactis*) sur le rendement et la qualité des fromages frais. Mémoire de master. Université Ibn khaldoun. Tiaret. p 32.

-S-

- ❖ **Savado A et Traore A. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. Int. J. Bio. Chem. Sci. 5(5) : Pp 2060-2063.

-Z-

- ❖ **Zourari A et Desmazeaud MJ. (1991).** Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II. Souches de *Lactobacillus delbueckii* subsp *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. Lait, p 474.



Annexes

Annexe 01

Composition des Milieux de cultures selon Larpent, (1997)

- **Milieu M17 bouillon (Oxoid ou Merck)**

Acide ascorbique	0.5g
Eau distillée	1000ml
Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Sulfate de magnésium	0.25g
Peptone de caséine	10g
Peptone de soja	5g
Peptone de viande	2.5g
B-glycérophosphate	19g

Stérilisation 15 minutes à 110°C

- **Milieu MRS bouillon (Man Rogosa et Sharpe)**

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.25g
MnSO ₄	0.05g

Gélose MRS

Composition de bouillon MRS + 10 g Agar (en g/l d'eau distillée)

Gélose MRS modifié

Composition de bouillon MRS + 10 g Agar (en g/l d'eau distillée) +0.3g de CaCO₃

- **Lait écrimé**

Eau distillée	100ml
Lait écrimé en poudre	10g

Autoclavage à 110°C pendant 10 min

Annexe 02

Coloration de Gram

La coloration de Gram, développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement utilisée en bactériologie. Elle est utilisée pour distinguer les organismes sur la base de leur coloration.

Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalaté ; laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme de bec Bunsen.

La safranine peut être remplacée par la fuchsine de Ziehl pendant 1 minute.

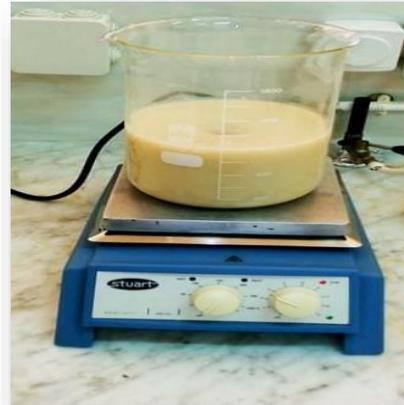
Observer au microscope à l'objectif x100 à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries (Gram-positif) apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries (Gram-négatif) sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

Annexe 03

Purification de l'argile

La purification de l'argile est donnée dans les photos 01,02et 03.



Photos 01 : Préparation de la suspension argileuse à 20 g d'argile dans 1 L d'eau distillée.



Photos 02 : Récupération de 400ml de surnageant par siphonnage.



Photos 03 : Filtration sous vide de la solution argileuse

Annexe 04

Lait en poudre (Candia)

Ingredients : poudre de Lait Entier (protéines 24.5%, lipides 26%), vitamines A et D, additifs à des fins alimentaires : émulsifiant : Lécithine de soja (BPF). Ce produit contient des traces de soja.

Valeurs nutritionnelles moyennes pour 100 g
نسبة 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	غليسيروز (غ)
dont lactose	40 g	منها اللاكتوز (غ)
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*)	كالمسيوم (غ)
Vitamines A (EAR)	450 µg	فيتامين A
Vitamines D	3,75 µg	فيتامين D

Aports journaliers recommandés

f CANDIA.ALGERIE



Photos 04 : lait en poudre de marque Candia.

Annexe 05

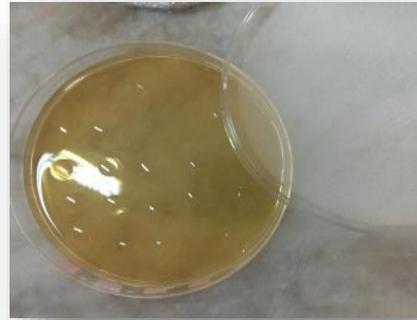
Les levains de *Streptococcus* et *Lactobacillus* fixées



Photos 05 : les levains immobilisées.

Annexe 06

Technique de micro-spots



Photos 06 : Technique de spots.

Annexe 07

Conservation des souches à courte durée



Photos 07 : Conservation des deux souches à courte durée.

Annexe 08

Cinétique des paramètres physico-chimiques et de croissance bactérienne

Tableau 07 : Les valeurs de la variation de pH en fonction de temps.

Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
pH	6.38	6.36	6.07	6.07	5.98	5.85	5.68	5.53	5.31	4.84

Tableau 08 : Les valeurs de l'acidité en fonction de temps.

Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Acidité °D	22	23	24	26	28	33	42	50	52	78

Tableau 09 : les valeurs de nombre de micro-spots en fonction de temps.

Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Log n	3	3.235	5.625 3	5.763 2	5.686	6.021 3	6.91	6.253 5	6.003 2	5.019

Tableau 10 : les valeurs de la densité optique en fonction de temps.

Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
DO	0.32 2	0.35 2	0.41 6	0.43 3	0.48 9	0.49 6	0.50 1	0.51 2	0.49 2	0.47 1

Annexe 09

Tableau 11 : Evaluation de l'analyse sensorielle de yaourt ferme préparé

Caractère sensorielle	Appréciations	% D'évaluation
Couleur	Jaunâtre	
	Blanchâtre	
	Crème	
Aspect	Sec	
	Hydratant	
	Normal	
Texture	Ferme	
	Granulée	
	Souple	
	Lisse	
Gout	Très bon	
	Bon	
	Moyen	
	Acide	
	Amère	
	Rance	
	Salé	
	Acide	
Odeur	Lben	
	Lait cru	
	Yaourt	
Appréciation globale	Le yaourt est très bon	
	Le yaourt est bon	
	Le yaourt est acceptable	
	Le yaourt est passable	

Résumé

Le principal objectif de notre travail est d'étudier un système d'inoculation du lait par une culture mixte de deux bactéries (*Streptococcus salivarius* subsp.*thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) immobilisées sur un support argileux (Bentonite de Maghnia) dans la fabrication de yaourt ferme. Une démarche expérimentale visant la ré-identification des souches a été adoptée commençant par des tests morphologiques qui ont confirmé que ces derniers sont des Gram positif sous forme de coques pour *Streptococcus thermophilus* et des bacilles pour *Lactobacillus bulgaricus* disposées soit en paire soit en chainettes. Quant au volet biochimique, il a mis en relief le fait que les deux sont à catalase négative et homofermentaire. L'évolution de l'acidité et du pH au bout d'incubation, révèle que le pH atteint une valeur minimale de 4,8 et l'acidité Dornic augmente jusqu'à 78°D, tandis que le suivi de la cinétique de coagulation du lait, nous a montré que le temps de coagulation est ralenti pour les ferments lactiques immobilisés.

En outre, le yaourt ainsi obtenu est jugé bon pour l'ensemble des dégustateurs.

Mots clés : Bentonite, immobilisation , *Lactobacillus bulgaricus* , *Streptococcus thermophilus* , yaourt , cinétique

الملخص

يهدف هذا البحث تحضير زبادي باستعمال نوعين من البكتيريا (*Streptococcus salivarius* subsp.*thermophilus*) و (*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*) المثبتتين على دعامة الصلصال (بنتونيت مغنية).

بهدف التعرف عليهما ارتأينا كمرحلة أولى بإجراء تجارب مرفولوجية اتضح من خلالها أنهما ايجابيات الغرام على شكل مكورات عنقودية (*Streptococcus thermophilus*) و عصيات (*Lactobacillus bulgaricus*) متوضعة إما على شكل سلاسل أو مزدوجة الترتيب

أما فيما يخص الاختبارات بيوكيميائية أظهرت كتالاز سالب ونتيجة التخمير متجانسة. بينت نتائج تطور الحموضة أن ph يصل إلى قيمة أدنى 4.8 بينما الحموضة تتزايد حتى 78°D في حين أن متابعة حركية تخثر الحليب أظهرت أن زمن التخثر بطيء باستخدام الخمانر المثبتة.

الكلمات المفتاحية : بنتونيت ، تثبيت ، حركية، *Streptococcus thermophilus*، *Lactobacillus bulgaricus* ، ياغورت .