

# 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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M<sup>elle</sup>. MOUAZI Malika Soumia

M<sup>elle</sup>. ZOUBIDA Hind

M<sup>elle</sup>. ZOUKH Maroua

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet de la fixation de *Streptococcus thermophilus* par des particules argileuses sur les paramètres de coagulation du lait**

Soutenu publiquement le : 22/09/2020

Jury:		Grade
President:	Mm. MOULAY M.	MCA
Promoteur:	M. BENBEGUARA M.	MCA
Co-Promoteur:	M. HADJ SAID A.	MCA
Examineur:	M. HOCINE L.	MCA

Année universitaire 2019-2020

## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions **ALLAH** le tout puissant qui nous a accordé le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Ce travail a été réalisé sous la supervision de **Mr. BENBEGUARA. M.** Nous lui exprimons tous nos remerciements pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité.*

*Nos remerciements s'adressent également au Co-promoteur **Mr. HADJ SAID** pour ses orientations qui' il nous a apporté dans la réalisation de ce travail.*

*Notre gratitude s'exprime également envers les membres de jury, la présidente **Mme. MOULAY. M** et l'examineur **Mr. HOCINE** qui ont bien voulu donner du temps pour examiner ce travail.*

*Un grand merci aux techniciennes du laboratoire **KHEIRA** et **ZAHRA** pour leur aide et d'avoir partagé leur savoir faire avec nous.*

*Afin de n'oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicaces

*Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux et de fidélité,*

*Je dédie ce travail :*

*A mes adorables et agréables parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que Dieu les bénisse.*

*Aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours pour vous. Merci pour vous être sacrifiée pour que vos enfants grandissent et prospèrent.*

*A mon frère MOHAMED et ma sœur SABRINA*

*A mes trinômes : MAROUA et HIND*

*A mes amies proches : IMENE, NADIA, HANANE, HAFSA, LAILA, WIDAD*

*A ma promotion de Master 2 Microbiologie Appliquée 2019-2020*



**MALIKA SOUMIA**

## Dédicaces

*Spécialement a ma très chère père ZOUBIRE ma très chère mère MIMONA pour leur soutien, leur sacrifice, que je souhaite une longue et heureuse vie.*

*A ma grand mère KHAIRA Rabi yarhamha, que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*A mes adorables et chères sœurs Djahida, Fatima Chaima,*

*A mon frère unique YAHIA Abdallah que dieu vous protégé*

*A mes tantes Khaldia, Yamina*

*A ma copine Sokër Fatima Zohra qui m'a toujours encouragé et soutenu dans tous les moments et que dieu garde à mes coutés.*

*A Mon ami Aissa Abdelbaki pour leur soutien moral.*

*A mes collage Maroua, Malika avec les quelle j'ai partage ce travail ou j'ai passé des moments inoubliable.*

*A tout la promotion de microbiologie appliquée 2019-2020*



**HIND**

## Dédicaces

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à dieu tout puissant.*

- *A mes très chers parents pour leur soutiens leur encouragements leur sacrifices*
- *A mes frères et mes sœurs*
- *A mes trinômes Malika Soumia, Hind qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail*
- *A ma deuxième famille qui sont mes amies surtout Nadia, Imane, Widad, Hanane, Laila.*
- *A mes amies de la promotion de master 2 microbiologie appliquée et a tous enneigements durant ma vie scolaire et universitaire*
- *A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité leur nom*



**MAROUA**

# **Sommaire**

# Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des figures.....	iii
Introduction.....	01

## *Première partie : Synthèse bibliographique*

1. Lait.....	02
1.1. Définition.....	02
1.2. Composition du lait.....	02
2. Yaourt.....	02
2.1. Définition.....	02
2.2. Composition de yaourt.....	03
2.3. Types de yaourt.....	03
2.3.1. Technologie de Fabrication.....	03
2.3.2. Teneur en matières grasses .....	04
3. Les bactéries lactiques.....	04
3.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	04
3.2. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .....	05
3.3. Classification.....	05
4. Argiles.....	06
4.1. Définition.....	06
4.2. Bentonite.....	06
5. Immobilisation cellulaire.....	06
5.1. Définition.....	06
5.2. Techniques d'immobilisation.....	06
5.3. Immobilisation par adsorption.....	07

## *Deuxième partie : partie expérimentale*

### *Chapitre I : matériel et méthodes*

1. Objectifs du travail.....	08
2. Lieu de travail.....	08
3. Matériel et méthodes.....	08
3.1. Matériel.....	08
3.1.1. Matériel biologique.....	08
3.1.2. Matériel Minéral.....	08
3.1.3. Matériel de laboratoire.....	09
3.2. Méthodes.....	11
3.2.1. Protocole expérimentale.....	11
3.2.2. Isolement et identification des souches.....	12
3.2.3. Isolement et purification des souches.....	13
3.2.3.1. Technique d'isolement.....	13
3.2.3.1.1. Préparation de la solution mère.....	13
3.2.3.1.2. Préparation de la dilution décimale.....	13
3.2.3.1.3. Ensemencement.....	13
3.2.3.2. Purification.....	14
3.2.4. Identification.....	14
3.2.4.1. Etude morphologique.....	14
3.2.4.1.1. Examen macroscopiques.....	14
3.2.4.1.2. Examen microscopiques.....	14
3.2.4.2. Etude biochimiques.....	15
3.2.4.2.1. Test de la catalase.....	15
3.2.4.2.2. Type fermentaire.....	15



3.2.5. Conservation à courte durée.....	15
3.2.6. Préparation de la suspension d'argile.....	16
3.2.6.1 La purification de l'argile.....	16
3.2.6.2 Détermination de la concentration.....	17
3.2.7. Préparation du levain lactique .....	18
3.2.8. La standardisation des ferments .....	18
3.2.9. Préparation du lait écrémé .....	18
3.2.10. Fixation de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	18
3.2.11. Fabrication de yaourt.....	19
3.2.12. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne...	21
3.2.12.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques.....	21
3.2.12.1.1. PH.....	21
3.2.12.1.2. Acidité.....	21
3.2.12.2. Cinétique de croissance bactérienne .....	22
3.2.12.2.1. Technique de spots.....	22
3.2.13. Analyse sensorielle.....	23

## ***Chapitre II : Résultats et discussion***

1. Isolement et purification des souches .....	24
1.1. Etude morphologique.....	24
1.1.1. Examen macroscopique.....	24
1.1.2. Examen microscopique.....	25
1.2. Etude biochimique .....	26
1.2.1. Test de catalase.....	26
1.2.2. Type fermentaire.....	27
2. Détermination de la concentration en argile.....	28

3. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne.....	28
3.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques.....	28
3.1.1. pH et l'acidité.....	28
3.2. Cinétique de croissance bactérienne.....	30
3.2.1. Technique de spots .....	31
4. Représentation des articles.....	31
4.1 Les résultats de l'article de Champagne et <i>al.</i> , (2000).....	31
4.2 Les résultats de l'article de Moulay et <i>al.</i> , (2016).....	33
4.3 Les résultats de l'article de Vasilica et <i>al.</i> , (2014).....	34
4.4 Les résultats de l'article de Suzana et <i>al.</i> , (2013).....	36
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>

## **Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé**

**الملخص**

## Liste des abréviations

- ✓ **AL** : acide lactique
- ✓ **LAB** : bactéries lactiques
- ✓ **Lb** : *Lactobacillus*
- ✓ **NaOH** : Hydroxyde de Sodium
- ✓ **Str** : *Streptococcus*
- ✓ **Subsp** : Sous espèce
- ✓ **TCI** : technologie des cellules immobilisées
- ✓ **Trs** : Tours

## Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Composition moyenne de lait de vache	<b>02</b>
<b>02</b>	composition nutritionnelle de différents types de yaourt	<b>03</b>
<b>03</b>	Classification des bactéries lactiques du yaourt	<b>05</b>
<b>04</b>	Appareillages, verreries et autres matériels	<b>09</b>
<b>05</b>	Réactifs chimiques, solutions et milieux de cultures	<b>10</b>
<b>09</b>	Influence des variables expérimentales sur la cinétique du processus de fermentation	<b>34</b>

## Tableaux des annexes

<b>10/12</b>	Les valeurs de variation du pH en fonction du temps	<b>Annexe04</b>
<b>11/13</b>	Les valeurs de l'acidité en fonction du temps	<b>Annexe04</b>
<b>14</b>	Les valeurs de nombre des micro-spoten en fonction du temps	<b>Annexe04</b>

## Liste des figures

Numéro	Titre	Pages
<b>01</b>	Protocole expérimental	<b>11</b>
<b>02</b>	Les étapes de l'isolement des souches	<b>12</b>
<b>03</b>	Les étapes de la purification de l'argile	<b>16</b>
<b>04</b>	Le diagramme général de la fabrication de yaourt ferme	<b>20</b>
<b>05</b>	Observation macroscopique de la souche sur le milieu M17	<b>24</b>
<b>06</b>	Aspect macroscopique de la souche sur milieu M17 liquide	<b>25</b>
<b>07</b>	Aspect microscopique et arrangement de la souche après coloration de Gram	<b>25</b>
<b>08</b>	Test de catalase de la souche	<b>26</b>
<b>09</b>	Type fermentaire de la souche	<b>27</b>
<b>10</b>	Cinétique d'évolution de pH et de l'acidité en fonction de temps sous l'action des ferments fixées	<b>28</b>
<b>11</b>	Cinétique d'évolution de pH et de l'acidité en fonction du temps sous l'action des ferments libres	<b>28</b>
<b>12</b>	Cinétique de croissance de la culture mixte des souches immobilisées en fonction de temps	<b>30</b>
<b>13</b>	Croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> BT1 dans des billes d'alginate à 37 C °	<b>31</b>
<b>14</b>	Influence du temps de latence en fonction de niveau d'inoculation	<b>32</b>
<b>15</b>	Influence du pH final en fonction de niveau d'inoculation <ul style="list-style-type: none"> <li>○ culture cellulaire libre</li> <li>● technologie des cellules immobilisées</li> </ul>	<b>32</b>
<b>16</b>	Courbe de croissance des souches bactériennes S1, S2 et S3 en fonction du temps dans le culot <ul style="list-style-type: none"> <li>S1 : <i>Lactobacillus fermentum</i></li> <li>S2 : <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i></li> <li>S3 : <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>	<b>33</b>
<b>17</b>	le nombre LAB en fonction de la température de fonctionnement des conditions ultrasoniques à différentes valeurs du rapport argile /lait colonne blanche R0=0, colonne gris clair R1=1, colonne gris moyen R2=5, colonne gris foncé R3=7,5	<b>35</b>

# **Introduction**

## Introduction

La filière laitière occupe une place importante à l'échelle mondiale en terme de contribution à l'occupation des surfaces agricoles aux emplois et la création de richesse (Srairi *et al.*, 2019).

Les laits fermentés sont des produits laitiers obtenus par une fermentation essentiellement lactique du lait, qui aboutit à son acidification et sa gélification (Béal et Hellink, 2019). Elle correspond à la transformation du lactose du lait en acide lactique sous l'action des microorganismes spécifiques dites les bactéries lactiques qui forment un groupe microbien hétérogène (Corrieu et Luquet, 2008).

Le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique due à la culture protosymbiotique de 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 ; Macori et Cotter, 2018). Il est un produit laitier très digeste et très apprécié par les consommateurs (Dudez *et al.*, 2017) pour son gout et sa texture et possédant une grande valeur nutritionnelle.

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 a 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).

Notre objectif principal est de voir les effets de l'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* par un support argileux sur les paramètres de coagulation du lait.

**Première partie :**  
**Synthèse**  
**bibliographique**



## 1. Lait

### 1.1. Définition

Le lait est le produit intégral de la traite totale est ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (Multon et al., 2013).

Selon Kassa et al., (2016), le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles.

Du point de vue physicochimique le lait est un produit complexe, une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (Vignola, 2002).

### 1.2. Composition

Le tableau 01 donne la teneur moyenne des principaux composants du lait de vache.

**Tableau 01** : la teneur moyenne des composants du lait de vache (Vignola ,2002).

Composants	Teneur %
-Eau	87,5
-Glucide	4,6
-Matière grasse	3,5
-protéine	3,2
-Minéraux	0,8

## 2. Yaourt

### 2.1. Définition

Selon le codex alimentarius le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par la fermentation lactique grâce à *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition (de lait en poudre, poudre de lait .....). Les bactéries lactiques doivent être viables et abondantes, dans le produit à raison d'au moins  $10^7$  bactéries /g.

Lors de la mise en consommation d'acide lactique libre contenue dans le yaourt ne doit pas être inférieur à 0,8g pour 100g de produit (**Mahaut et al., 2000**).

### 2.2. Composition de yaourt

La composition nutritionnelle de différents types de yaourts pour 100g de produit est donnée dans le tableau 02.

**Tableau 02** : Teneur moyenne du yaourt pour 100g de produit (**Anses, 2008**).

<b>Types de yaourt</b>	<b>Energie (Kcal)</b>	<b>Eau (g)</b>	<b>Protéine (g)</b>	<b>Glucide (g)</b>	<b>Lipides (g)</b>
Yaourt nature au lait entier	70,6	86,5	3,8	5	3,6
Yaourt nature au lait partiellement écrémé	47,7	88,2	4	4,8	1,02
Yaourt nature 0% au lait écrémé	42	88,6	4,4	5,1	0,07
Yaourt aromatisé sucre au lait demi-écrémé	84,8	81,1	3,1	14,2	1,4
Yaourt aux fruits sucre au lait demi-écrémé	91,8	77,6	3,2	15,2	1,69

### 2.3. Types de yaourt

Les différents types de yaourt sont classés en fonction de :

#### 2.3.1. Technologie de fabrication

Selon **Romain et al., (2008)**, les types de yaourt sont :

- ✓ yaourts fermes, dont la fermentation a lieu en pots : ce sont généralement les yaourts nature et aromatisés ;
- ✓ yaourts brassés, dont la fermentation a lieu en cuve avant brassage et conditionnement : c'est le cas des yaourts veloutés naturels ou aux fruits.

### 2.3.2. Teneur en matière grasse

D'après **Vignola (2002)**, les types de yaourt en fonction de la teneur en matière grasse sont :

- ✓ yaourt entier, la matière grasse en minimum 3% ;
- ✓ yaourt partiellement écrémé, est caractérisé par une teneur de matière grasse varie entre 0,5% à 3% ;
- ✓ yaourt ferme, la teneur en matière grasse ne dépasse pas 0,5%.

### 3. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, organotrophes, formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilles (**Badis et al., 2005**). Ce sont des bactéries à coloration de Gram positive, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydases, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractériser par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. Ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aérotolérantes, exigeantes en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines (**Fedegighi, 2005**).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes :

Homofermentaire et hétérofermentaires basées sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose (**Priyanka et Parkash, 2009**).

#### 3.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

*Lb.bulgaricus* est un bacille, immobile, asporulé et microaérophile. Elle est isolée sous forme de bâtonnets en chaînettes, possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principale produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Embden Meyerhof. Elle est incapable de fermenter les pentoses, c'est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Elle a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (**Marty-Teyssset et al., 2000**).

### 3.2. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

C'est une bactérie Gram positif, anaérobie facultative, cytochrome oxydase et catalase négatifs, non mobile, non sporulé et homofermentaire, généralement cette souche se présente sous la forme de cocci excitant en paires et en chaîne. Il est classé comme thermophile poussant à 45°C et sans croissance en 10°C (Grumezescu et Holban, 2019).

*Streptococcus thermophilus* est une exception dans le genre *Streptococcus* car c'est la seule espèce qui n'est pas pathogène appartenant au groupe des bactéries ayant un intérêt industriel et nutritionnel reconnu sous le nom GRAS (generally recognized as safe) (Dellaglio et al., 1994; Hols et al., 2005). Elle est largement utilisée en combinaison avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* et/ou *Lactococcus helveticus* en tant que culture starter pour le yaourt et autres produits laitiers fermentés ainsi que pour le fromage de type suisse et italien (Hols et al., 2005 ; Savadogou et Traore, 2011).

### 3.3. Classification des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques est présentée dans le tableau 03.

**Tableau 03** : classification des bactéries lactiques des yaourts (Vos et al., 2011).

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

## 4. Argile

### 4.1. Définition

Les argiles sont des roches sédimentaires qui proviennent de la lente d'érosion de granites. Ce sont des silicates d'aluminium hydraté disposé en feuillets (**Ragot, 2011**).

D'après **François(2016)**, selon leur composition et leur concentration en minéraux, les différentes argiles ont des structures et des propriétés différentes.

### 4.2. Bentonite

La bentonite est une dénomination de la montmorillonite, cette dernière a été découverte dans les gisements argileux situés près de Montmorillon dans la vienne France (**Mohellebi ,1999**).

Elle est une roche composée d'argile fortement colloïdale et plastique, principalement de la montmorillonite, un minéral argileux du groupe de la smectite (**Zoltan et al., 2005**) composé de deux feuilles de silice et d'un aluminium (**Ait-Hmeid et al., 2020**). La bentonite est largement utilisée dans nombreux secteurs industriels (pharmacie, cosmétique, chimie, génie civil, agroalimentaire.....) (**Kouloughi, 2007**) en raison de ses caractéristiques structurales, de son faible cout, de sa disponibilité et de son abondance dans la nature (**Wang et al., 2005 ; Moussa et al., 2020**).

## 5. Immobilisation cellulaire

### 5.1. Définition

L'immobilisation cellulaire a été définie comme le confinement physique ou la localisation des cellules microbiennes viables dans un espace précis (**Suzana et al., 2013**). Elle peut se produire soit comme un phénomène naturel soit un processus artificiel (**Ramakrishna et Prakash ,1999**). Les microorganismes peuvent se fixer à la surface solide par leurs propriétés bio-adhésive afin de former un biofilm qui peut être utilisé dans plusieurs domaines notamment ceux alimentation et traitement des eaux (**Moulay et al., 2016**).

### 5.2 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.

### 5.3. Immobilisation par adsorption

L'adsorption est le procédé le plus ancien utilisé dans la fermentation, il est basé sur l'interaction d'ordre électrostatiques entre les supports et l'enveloppe des microorganismes chargé négativement, c'est une méthode simple d'immobilisation réversible (**Suzana et al., 2013**). Cette technique imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associé à des surfaces et se développant en biofilm (**Dune, 2002**).

**Deuxième partie :**  
**Partie expérimentale**

# **Chapitre I :**

## **Matériel et méthodes**



## 1. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de notre étude est de voir l'effet de l'immobilisation de la souche *Streptococcus thermophilus* par des particules argileuses de type Bentonite sur l'évolution des paramètres de coagulation du lait (pH, acidité, la croissance bactérienne) et la qualité sensorielle de yaourt ferme, et il s'articule autour des points suivantes :

- ❖ Isolement et identification de la souche *Streptococcus thermophilus* à partir d'un yaourt nature/souche lyophilisée.
- ❖ Immobilisation de l'isolat par des particules argileuses.

## 2. Lieu de travail

Notre travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie et science alimentaire au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. **Université Ibn Khaldoun- Tiaret.**

## 3. Matériel et méthodes

### 3.1. Matériel

#### 3.1.1. Matériel biologique

##### ❖ Souche

La souche utilisée est le *Streptococcus thermophilus* lyophilisée.

##### ❖ Yaourt

Yaourt utilisé est yaourt nature de Marques SOUMAM et HODNA commercialisés dans la Wilaya de Tiaret.

##### ❖ Lait

Deux types du lait utilisés :

- ✓ lait entier en poudre de marque Candia à 26% de matière grasse provient du commerce ;
- ✓ un lait écrémé à 0% de matière grasse provient de L'OROLAIT Tiaret.

### 3.1.2. Matériel minérale

#### ❖ Argile

L'argile utilisée c'est la bentonite qui provient d'un gisement de Maghnia situé à l'ouest de Tlemcen.

### 3.1.3. Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé dans notre expérimentation est résumé dans les tableaux 04 et 05.

**Tableau 04** : Appareillages, verreries et autres.

<b>Appareillages</b>	<b>Verrerie</b>	<b>Autres</b>
-Agitateur magnétique (STUART/SB162)	-Bécher (100, 250,500 ,1000 ml)	-Bac de coloration
-Autoclave(SATTDAMPF)	-Burettes graduée (100 ml)	-Barreau magnétique
-Bain marie secoureur (MEMMERT)	-Clocher du durham	-Bec Bunsen
-Balance analytique (SARTORIUS BASIC)	-Dessiccateur	-Papier aluminium
-Etuve (MEMMERT)	-Eprouvettes graduées 10,500 ,1000ml)	-Papier film
-Microscope optique(OPTIKA)	-Entonnoir	-Papier filtre
-Pompe à vide	-Fiole jaugé 150 ,100ml	-Pissettes
-Réfrigérateur (CONDOR)	-Flacons en verres	-Pince en bois et en métal
-Vortex (WISEMIX)	- Lames	-Portoir
-pH-mètre (HANNA)	-Micropipette 10µl	-Seringues (5et 10ml)
	-Pipettes graduées 1,2 ,5 et 10ml)	-Spatules
	-Pipette pasteur	-Tamis (50µl)
	-Tubes à essais	
	-Verres de montre	

**Tableau 05** : Réactifs chimiques, solutions et milieux de culture.

<b>Réactifs</b>	<b>Milieu de culture</b>
-Alcool (96%) -Bleu de méthylène -Eau distillée -Eau oxygénée (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) - Eau physiologique -Fuchsine (1%) -Glycérol -Lugol -NaOH -Violet de gentiane (1%) -Phénothaldéine	-Milieu M17 et Milieu MRS (bouillon et gélose) voire (annexe01)

### 3.2. Méthodes

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

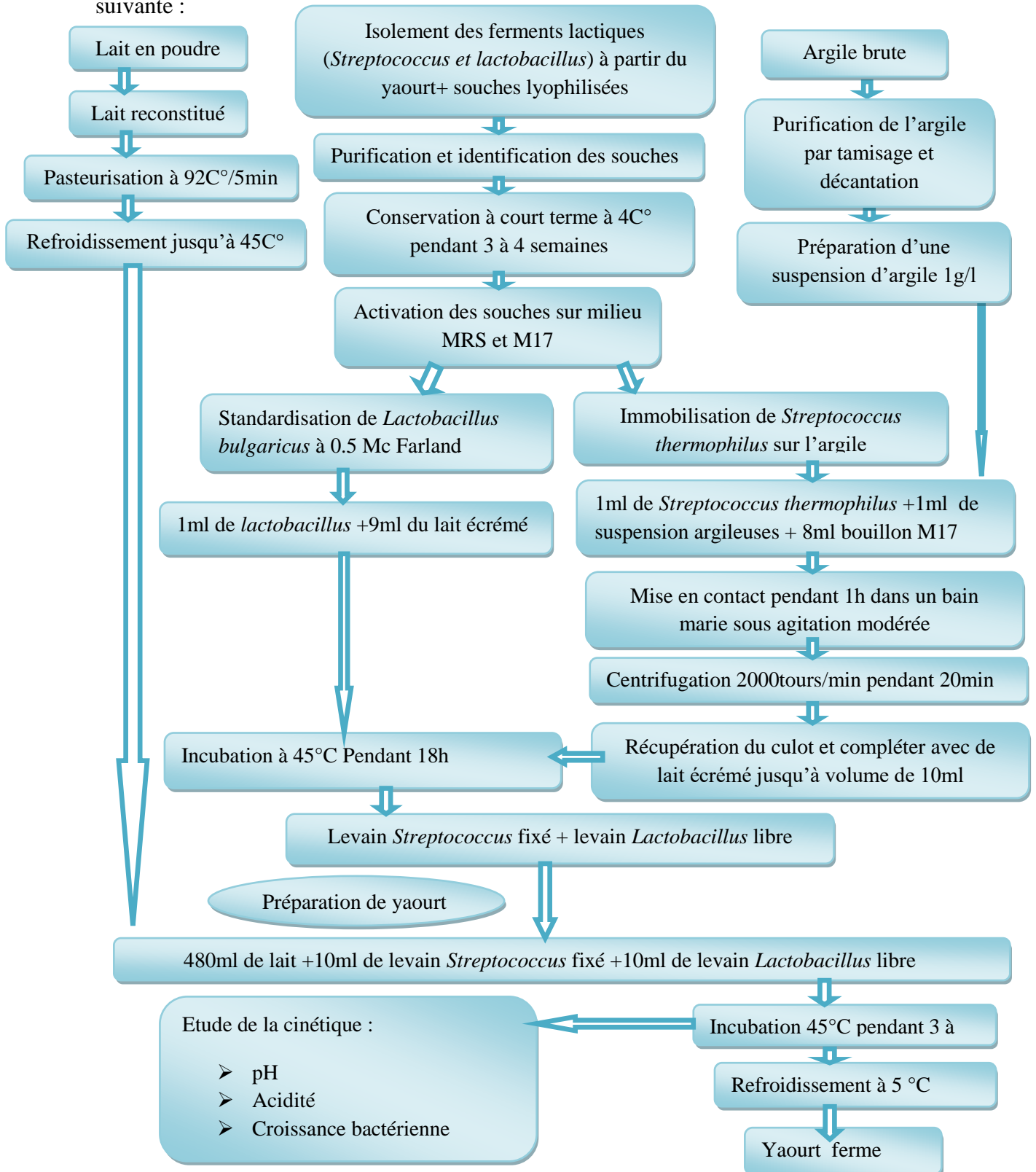


Figure 01 : Protocole expérimental prévu à réaliser.

L'ensemble des méthodes prévues pour la réalisation de notre travail sont énumérés comme suit :

### 3.2.2. Isolement et identification de la souche *Streptococcus thermophilus*

La figure 02 résume les étapes de l'isolement de la souche (partie réalisée).

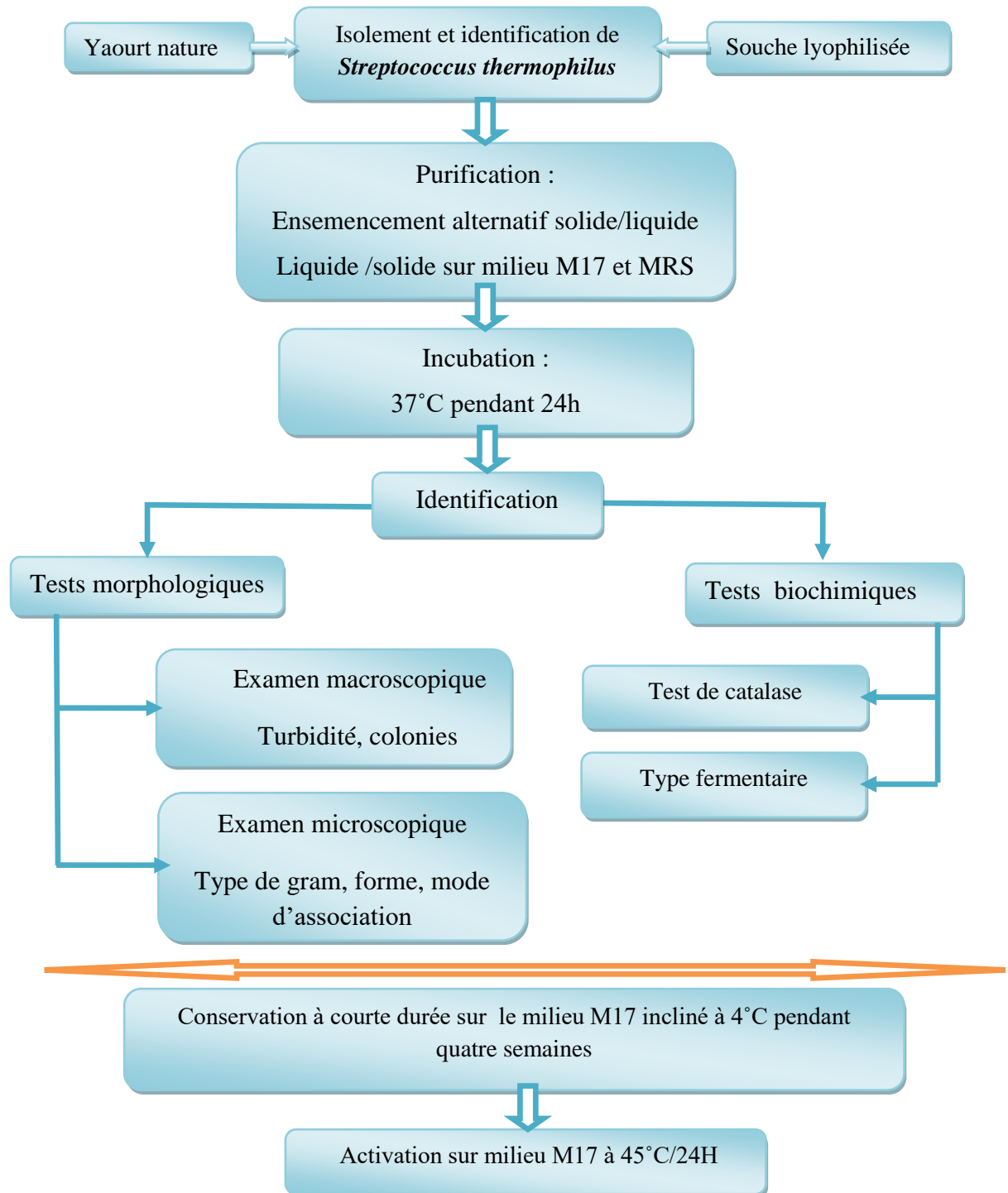


Figure 02 : Les étapes d'isolement et de l'identification de la souche

### 3.2.3. Isolement et purification de *Streptococcus thermophilus*

Le *Streptococcus thermophilus* est une espèce qui peut être présentée dans différents écosystèmes laitiers ou autres. Dans notre travail, l'isolement de cette espèce thermophile a été effectué à partir de yaourts naturels de marque HODNA et SOUMMAM et à partir des souches lyophilisées (annexe 03).

#### 3.2.3.1 Techniques d'isolement

##### 3.2.3.1.1. Préparation de la solution mère

Pour la préparation de la solution mère, 1g d'échantillon a été prélevé aseptiquement et introduit dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique stérile. Le mélange est en suite agité au vortex, donc on obtient ainsi la dilution  $10^{-1}$  (Begloul, 2011).

##### 3.2.3.1.2. Préparation de dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution.

Un ml de la première dilution (solution mère) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette graduée stérile et introduit dans un tube à essai contenant 9ml de l'eau distillée stérile le mélange est agité au vortex.

On effectue en suite, des dilutions décimales jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ .

##### 3.2.3.1.3. Ensemencement

L'isolement de la bactérie est effectué par l'étalement de 0.1ml de différentes dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ) sur un milieu gélosé M17 (ensemencement par des stries) préalablement collé et solidifié sur des boîtes pétries.

Pour la souche lyophilisée, nous avons incorporé les ferments lactiques à raison de deux grains de la souche mixte dans un tube à essai contenant un bouillon de MRS (Belmokhtar et al., 2019).

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h à 48h.

### 3.2.3.2. Purification

La purification est effectuée par repiquage successif de la souche sur le milieu de culture M17 ensemencé en strie et sur les bouillons M17 et MRS (solide/liquide) (liquide/solide).

Les boîtes et les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures (**Labioui et al., 2005**).

### 3.2.4. Identification de la souche

La ré-identification de la bactérie est établie en basant sur l'étude de leurs caractères morphologiques (examen macroscopique et microscopique) et divers caractères biochimiques : test catalase et type fermentaire.

#### 3.2.4.1. Etude morphologique

L'étude morphologique est portée sur la description des aspects morphologiques (macroscopiques et microscopiques) de la souche (**Guiraud, 1998**).

Elle permet une orientation préliminaire pour l'identification.

##### 3.2.4.1.1. Examen macroscopique

Ce test permet de décrire l'aspect de colonies obtenues sur le milieu M17 en tenant compte la détermination des critères suivants : taille, couleur et forme des colonies (**Guiraud, 2003**).

##### 3.2.4.1.2. Examen microscopique

Les colonies obtenues sur le milieu M17 sont suivies par une coloration de Gram, à pour but de déterminer la forme des cellules, mode d'association et leur type de Gram (**Delarras, 2014**).

#### Coloration de Gram

Cette technique permet de distinguer entre les bactéries à Gram+ et à Gram-.

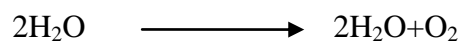
Un frottis préparé est recouvert avec le violet de gentiane et laissé pendant 1 min, après rinçage avec l'eau distillée, le lugol est déposé pendant 1min pour le mordantage. La lame est décolorée en utilisant l'éthanol à 95% (5 à 10 s) puis, rincée immédiatement à l'eau distillée. À la fin, le frottis est recouverte par la fuchsine pendant 1min, la lame est rincée et séchée.

L'observation se fait à l'immersion en utilisant l'objectif 100.

### 3.2.4.2. Tests biochimiques

#### 3.2.4.2.1. Test catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives. Elle permet la dégradation de l'eau oxygénée en eau et en oxygène (**Delarras, 2014**). Selon la réaction suivante :



Ce test est mis en évidence sur une lame stérile, en émulsionnant une colonie de l'isolat à tester qui est prélevé dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes (**Delarras, 2014**).

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'activité du catalase, le contraire indique l'absence de l'enzyme.

#### 3.2.4.2.2. Type fermentaire

Les bactéries sont connues par leurs propriétés fermentaires d'un nombre important de substrat glucidique.

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, incubées à 37°C pendant 24 à 48h .Le développement d'une bactérie hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham qui est absente chez les bactéries homofermentaires.

### 3.2.5. Conservation de la souche

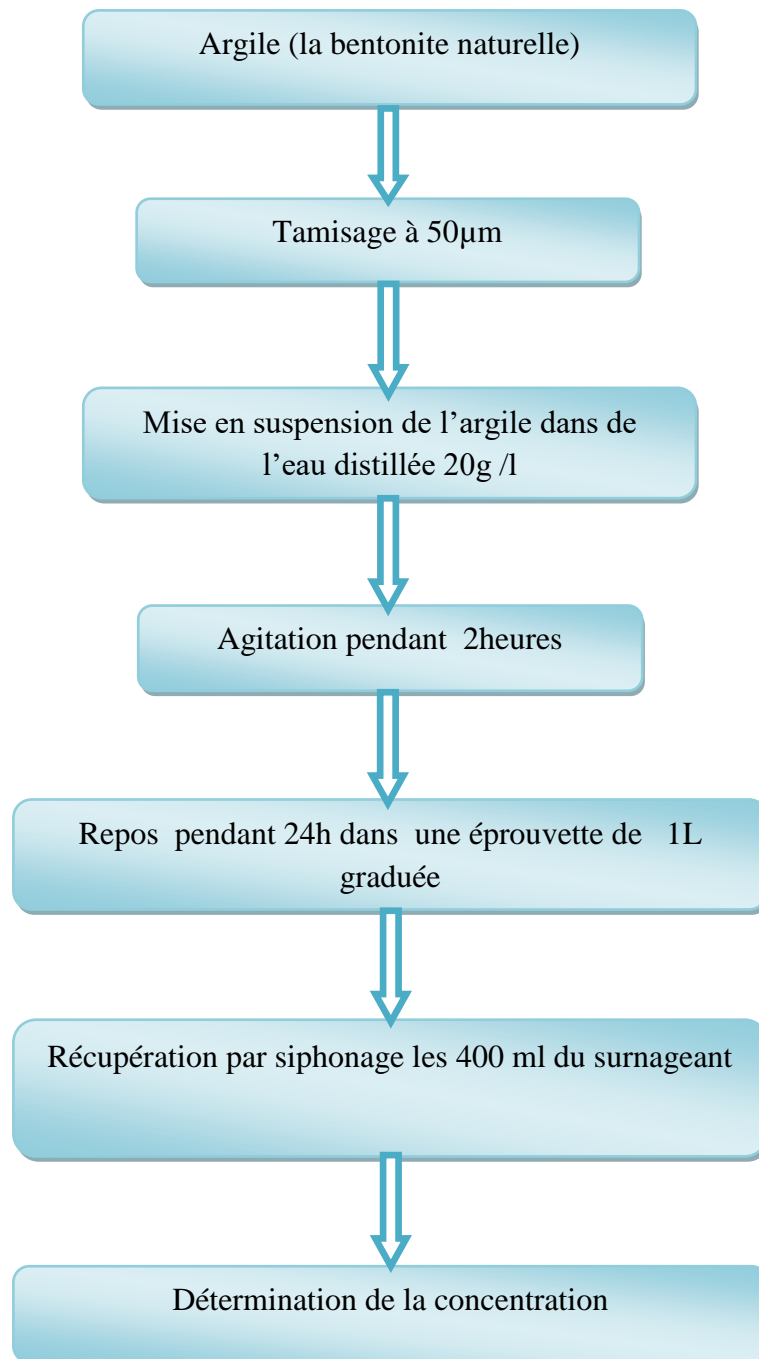
Après la croissance, La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur les milieux MRS et M17 inclinées à 4°C pendant quatre semaines (**Badis et al., 2005**).



### 3.2.6. Préparation de la suspension d'argile

#### 3.2.6.1. Purification de l'argile

D'après **Moulay et al., (2016)**, Les étapes de la purification d'argile sont illustres dans la figure 03.



*Figure 03 : Les étapes de purification de l'argile*

### 3.2.6.2. Détermination de la concentration en argile

D'après **Hadj Said et al., (2019)**, La concentration d'argile est déterminée comme suit :

- ✓ Sécher le papier filtre vide dans l'étuve à 105°C jusqu'au poids constant  $P_1$  le poids du papier filtre vide exprimé en (g) ;
- ✓ Retirer 50 ml de la suspension argileuse siphonnée qu'on filtre sous vide ;
- ✓ Récupérer le papier filtre et le sécher dans un l'étuve à 105° C pendant 30 min jusqu'à poids constant  $P_2$  le poids du papier filtre avec les particules argileuses exprimé en (g) ;
- ✓ Après chaque séchage mettre le papier filtre dans un dessiccateur pendant 10 min afin d'éviter la fixation d'humidité.

L'expression de résultats de la concentration en argile est déterminée selon le rapport suivant :

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

Dont :

- ✓  $C_a$  : la concentration en argile de la suspension siphonnée 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. Suivant 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 en (ml) ;

$V_2$  : volume de la suspension préparée en (ml).

### 3.2.7. Préparation du levain lactique

#### Les ferments lactiques

Un ferment lactique est une préparation comprend un grand nombre de microorganisme (une seul espèce ou plusieurs) qui est ajoutée au lait pour produire un aliment fermenté en accélérant et orientant son processus de fermentation (**Yildiz, 2010**).

### 3.2.8. La standardisation des ferments

Le levain est préparé par l'inoculation des ferments dans le lait écrémé puis incubé à 45°C pendant 24h et ce après vérification de la pureté et la standardisation des deux souches bactériennes (*Streptococcus thermophilus* fixée et de *Lactobacillus delbrekii* sups. *bulgaricus* libre).

Le standard 0,5 Mc farland est notamment utilisé lors de la préparation des inoculum bactériens.

### 3.2.9. Préparation du lait écrémé

Une quantité de 10g de lait écrémé en poudre est dissoute dans 100ml d'eau distillée stérile, la solution obtenue est stérilisée à 110°C pendant 10min (**Belmokhtar et al., 2019**).

### 3.2.10. Fixation de *Streptococcus thermophilus*

#### Mode opératoire :

Selon **Loukrif et al., (2019)**, l'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* se fait comme suit :

- ✓ Dans un tube à essai mettre 1ml de la culture bactérienne qui contienne *Streptococcus thermophilus* puis ajouter un 1ml de la suspension argileuse plus 8ml de bouillon M17 ;
- ✓ Laisser le mélange dans un bain marie sous agitation modérée pendant 1h ;
- ✓ La solution ainsi obtenue est centrifugée à 2000 trs /mn pendant 20 min ;
- ✓ Eliminer le surnageant et récupérer le culot (fixée) ;
- ✓ Compléter au volume de 10ml avec le lait écrémé puis incubé 37°C pendant 24h ;
- ✓ L'obtention des levains immobilisés.

### 3.2.11. Fabrication de yaourt

Les procédés de fabrication des yaourts et des laits fermentés se caractérisent par trois grandes étapes : la préparation du lait, la fermentation et les traitements post fermentaire du produit (Béal et Hellink, 2019).

D'après Dudez et al., (2017), Les ferments, les températures d'incubation, les temps d'incubation, l'emploi de poudre de lait sont autant des paramètres qui jouent sur les caractéristiques des produits finis : texture, fermeté, arôme, acidité....

Selon Romain et al., (2008), les étapes à suivre pour la fabrication du yaourt sont :

#### 1. Préparation du lait

Le lait préalablement standardisé (ajustement du taux de matière grasse enrichissement en matière sèche sous forme du lait en poudre) (Bourlioux et al., 2011), puis l'homogénéisation qui réduit la taille des globules gras et empêche la séparation entre le reste du mélange évitant ainsi la remontée de la crème à la surface durant la fermentation (Lamontagne, 2002).

#### 2. Traitement thermique

Selon Tamine et Robinson (2007), Le traitement thermique est effectué à une température allant de 80 à 85°C pendant 30 minutes ou entre 90-95°C pendant 5 minutes.

#### 3. Fermentation

Le lait estensemencé avec les levains de types *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* et doit se faire à un taux assez élevé pour assurer une acidification correcte : il varie selon la vitalité des culture entre 1 et 7% dans un rapport *Streptococcus thermophilus* /*Lactobacillus bulgaricus* de 1,2 à 2/1 pour les yaourts naturels.

#### 4. Incubation

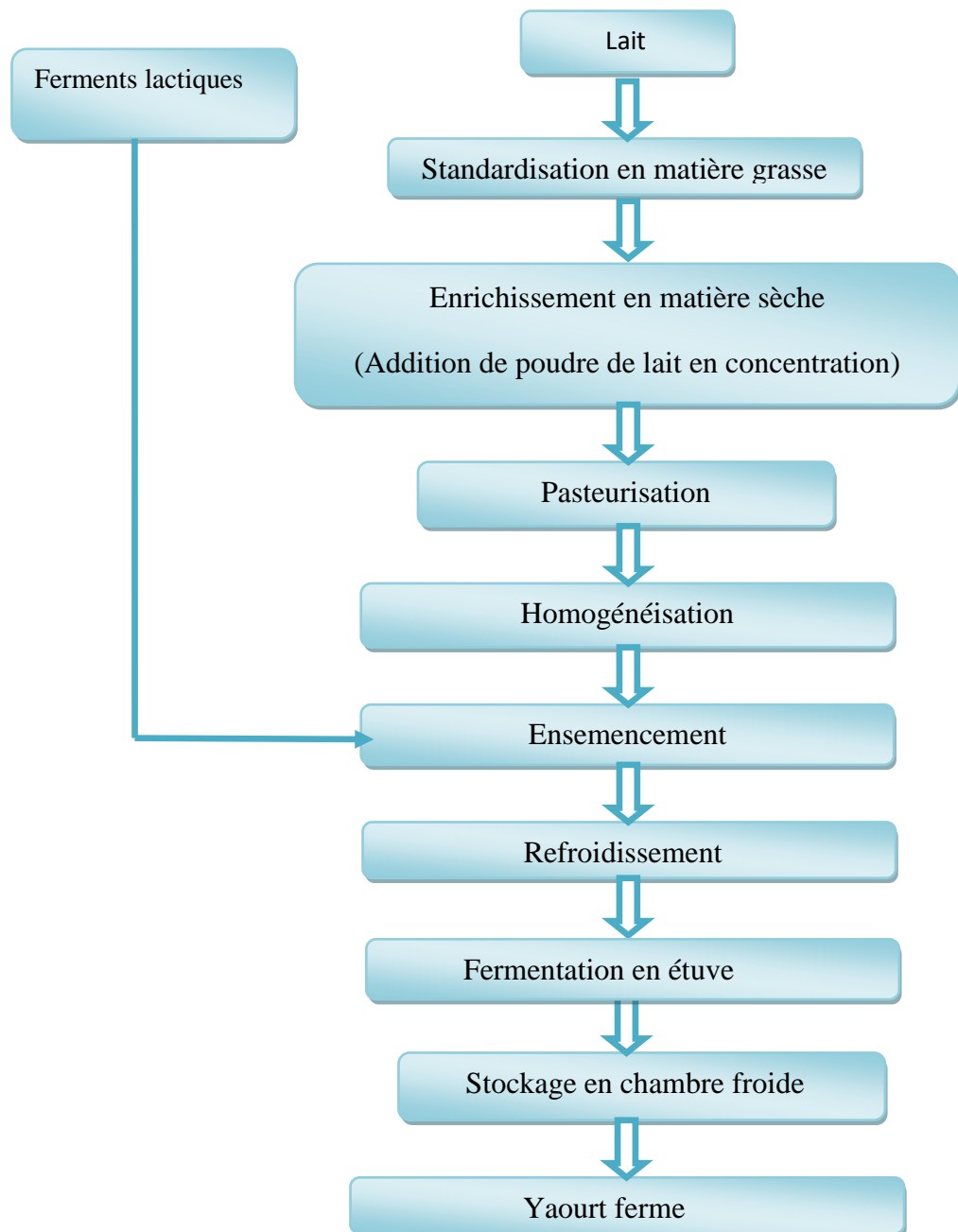
L'incubation se réalise à des températures comprises entre 42 et 45°C et dure entre 2h30 et 3h 30.

L'objectif de cette phase est d'atteindre une acidité de 70- 80°D dans le cas des yaourts étuvés.

## 5. Arrêt de la fermentation

D'après Mahaut *et al.*, (2008), Lorsque l'acidité est atteinte 70 à 80 °D , on procède à un refroidissement rapide entre 2 à 5°C pour bloquer la fermentation.

Les étapes de la fabrication du yaourt sont inspirées à partir du diagramme donnée par Bourlioux *et al.*, (2011) (figure 04).



*Figure 04 : Diagramme générale de fabrication de yaourt ferme (Boulioux et al., 2011)*

### 3.2.12. Etude Cinétique

#### 3.2.12.1. Cinétiques des paramètres physicochimiques

##### 3.2.12.1.1. PH

- **Principe**

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Les ions  $H^+$  et  $OH^-$  vont créer de légères charges négative et positive de part et d'autre de l'électrode est reliée au pH-mètre. Le potentiel de charge calculé par ce dernier permet de déterminer la quantité d'ions dans l'échantillon (Vignola, 2002).

- **Mode opératoire**

- ✓ Etalonner le pH-mètre avec des solutions tampons (pH =4 et pH=7) ;
- ✓ Nettoyer et rincer les électrodes et les prolonger dans un bécher contenant 19 ml de l'échantillon ;
- ✓ La valeur du pH de l'échantillon est obtenue directement par simple lecture.

##### 3.2.12.1. 2. Acidité titrable

Dans les procédés de fabrication des yaourts, des caillés, les crèmes, la mesure de l'acidité Dornic est utile pour vérifier la bonne activité des ferments lactiques et stopper les fermentations au bon moment (Dudez et al., 2017).

- **Principe**

L'acidité Titrable est la quantité de l'acide lactique contenant dans un litre du lait (Guiraud et Rose, 2004).

- **Mode opératoire**

- ✓ Verser dans un bécher 10 ml de l'échantillon et ajouter 3 à 4 gouttes de phénolphthaléine ;
- ✓ Remplir la burette avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1/9N, et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante ;
- ✓ Lire le volume du NaOH titré.

**Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés selon la relation 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.

**3.2.12.2. Cinétiques de croissance bactérienne**

La cinétique de la croissance bactérienne a été déterminée par la technique de spot

**3.2.12.2.1. Technique de spot**

Le dénombrement est une technique permettant de quantifier à l'œil le nombre d'unités bactériennes formant colonies (UFC).

On dépose 10µl de chaque dilution bactérienne (spot) sur une surface de gélose MRS, chaque spot est reproduit six 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 **Joffin et Leyral (2006)**, 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.

### 3.2.13. Analyse sensorielle du yaourt

L'analyse sensorielle consiste dans un ensemble de méthodes dont le but est de mesurer les perceptions sensorielles du destinataire (**Leprince, 2007**).

Selon **Tariket (2016)**, 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 goût ;
- ✓ La texture (résistance, consistance) révélée par le toucher.



# **Chapitre II:**

## **Résultats et discussion**

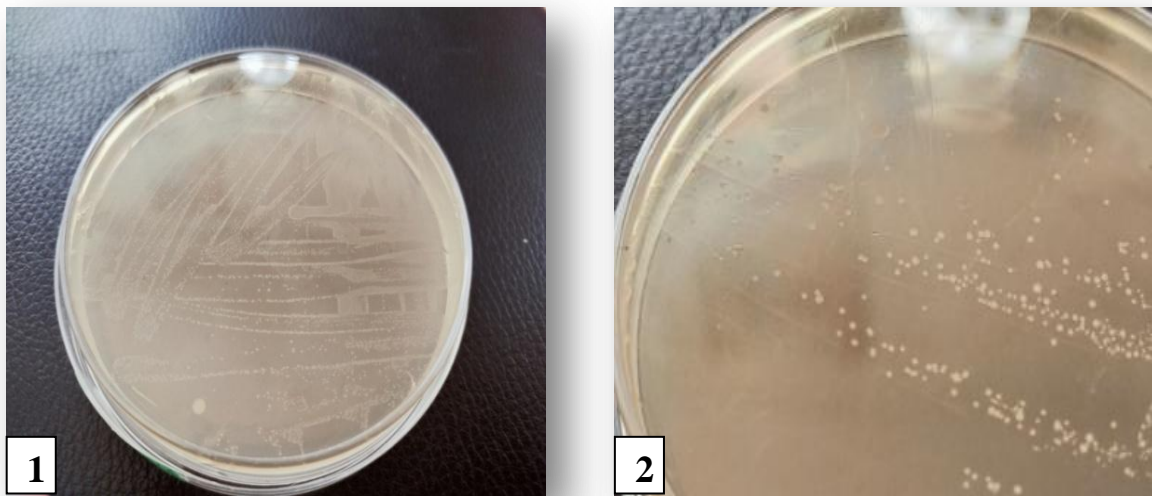
## Résultats et discussion

### 1. Isolement et purification de la souche

#### 1.1. Etude morphologique

##### 1.1.1. Examen macroscopiques

Les caractères macroscopiques de la souche *Streptococcus thermophilus* sont présentés dans les figures 05 et 06.



**Figure 05 :** Observation macroscopique de la bactérie *Streptococcus thermophilus* ensemencée dans le milieu M17 après une incubation de 37°C/24h pour les deux souches lyophilisée/ isolée à partir de yaourt.

**1 :** la souche isolée localement.

**2 :** la souche isolée à partir de souche lyophilisée.

D'après la **figure 05**, on constate l'apparition des petites colonies bien isolées de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre avec de forme lenticulaire sur le milieu M17 après une incubation de 37°C/24h.

L'observation macroscopique de développement de la souche sur le milieu M17 liquide montre un trouble dans le tube en profondeur, qui douée à une croissance bactérienne (**Figure 06**).



**Figure 06 :** Aspect macroscopique de *Streptococcus thermophilus* sur M17 liquide après 24h d'incubation à 37°C.

### 1.1.2. Examen microscopique

- **Coloration de Gram**

La figure 07 représente l'aspect microscopique de la bactérie *Streptococcus thermophilus*.



**Figure 07 :** Observation microscopique de la bactérie *Streptococcus thermophilus* ensemencée dans le milieu M17 après une incubation de 37°C/24h (GX100).

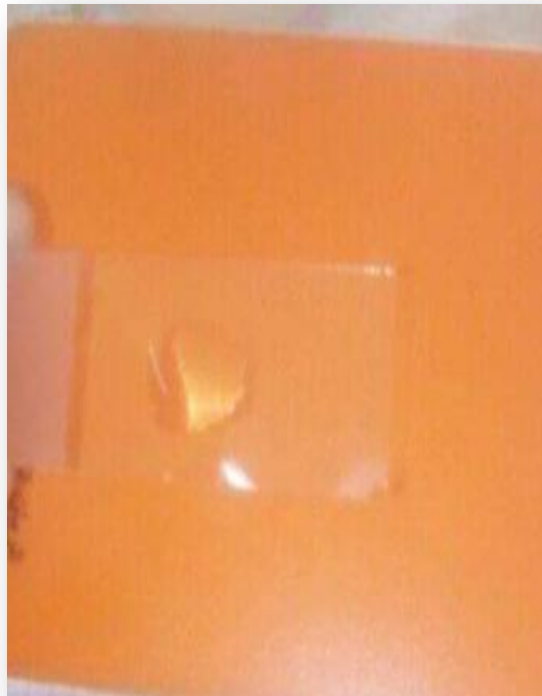
D'après la coloration de Gram, les observations microscopiques montrent que la souche retient de couleur violette alors elle est à Gram(+) et sous forme de coques disposées en paires et surtout en chaînettes.

Les résultats obtenus d'après l'observation microscopiques sont semblables aux travaux réalisés par **Badis et al., (2004)**.

## 1.2. Etude biochimique

### 1.2.1. Test catalase

Le test catalase réalisé pour la souche est illustré dans la figure 08.



*Figure 08 : Test de catalase de la souche Streptococcus thermophilus.*

Notre résultat indique une réaction négative, l'absence des bulles de gaz ce qui signifie que la souche à catalase négative.

### 1.2.2. Types fermentaire

La figure 09 représente le type fermentaire de la souche *Streptococcus thermophilus*.



*Figure 09 : Type fermentaire de la souche.*

L'absence des bulles au fond de la cloche confirme que la souche est incapable de produire un gaz alors leur métabolite de type homofermentaire.

Les résultats de l'étude biochimique de la souche sont comparables avec les travaux réalisés par **Hajd Saïd et al., (2019)**.

## 2. Détermination de la Concentration en argile

D'après l'étude de **Dahou et al., (2018)**, sur la cinétique de coagulation du lait par la Fromase 2200TL immobilisée sur un support argileux.

Ils ont trouvé une valeur de concentration en argile de la suspension siphonnée (50ml) est égale 14 g/l cette valeur est inférieure à celle trouvée par **Bouakka et al., (2016)**, qui ont trouvé une valeur de 17g/l.

Et d'après l'étude de **Loukrif et al., (2019)**, sur l'effet de l'immobilisation des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) par des particules argileuses sur les qualités du yaourt. La valeur de concentration en argile de la suspension siphonnée (50ml) est égale 17,45 g/l.

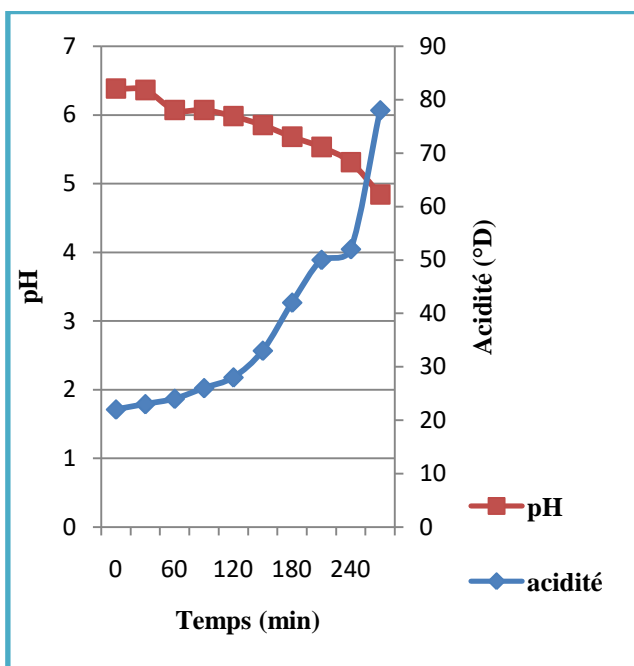
On remarquant que La valeur de concentration en argile de la suspension siphonnée n'est pas stable.

### 3. Cinétique des paramètres physico-chimiques et croissance bactérienne

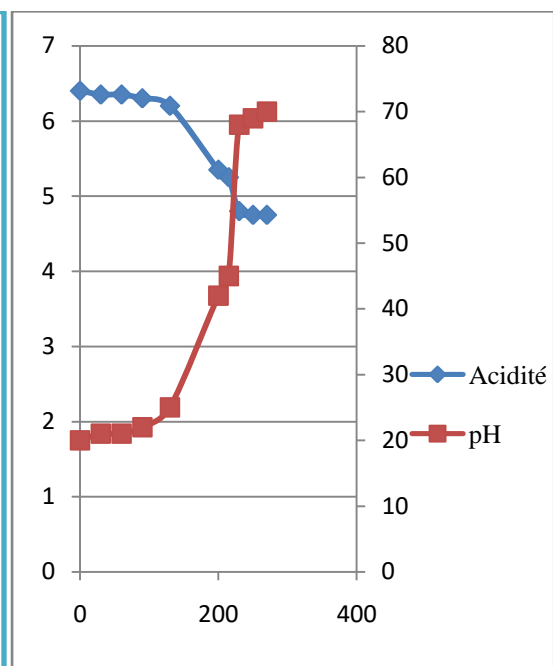
#### 3.1. Cinétique des paramètres physico-chimiques

##### 3.1.1. pH et acidité Titrable

Les résultats trouvés par **Loukrif et al., (2019)** et **Majdi, (2008)** de la variation de pH et l'acidité en fonction du temps de la fermentation du lait sous l'action des ferments immobilisés et libres sont présentés dans les figures 10 et 11.



**Figure 10 :** Evolution de pH et l'acidité en fonction du temps de la fermentation du lait obtenus par l'action des ferments immobilisés (Loukrif et al., 2019).



**Figure 11 :** Evolution de pH et l'acidité en fonction du temps de la fermentation du lait obtenus par l'action des ferments libres (Majdi, 2008).

D'après les courbes de l'acidité et du pH présentées dans les figures 10 et 11 :

Nous avons observé quelque soit le type de yaourt la diminution du pH correspond à l'augmentation de l'acidité durant 270 min d'incubation.

La valeur initiale de pH égale à 6,8 qui correspond à une valeur d'acidité de 22°D (**Loukrif et al., 2019**), cette valeur est supérieure à celle signalée par **Majdi (2008)** qui a trouvé à un pH = 6,4 une valeur d'acidité égale à 20°D.

Au cours du temps les valeurs du pH ont diminué progressivement jusqu'à pH à 4,84 pour la fermentation sous l'action des ferments immobilisés et un pH égal 4,75 pour les ferments libres au bout 270 min.

Les valeurs de l'acidité ont subi une augmentation très remarquable durant la période allant 2 à 4h, elle devient très rapide à la fin d'incubation qui atteint 78 °D (**Loukrif et al., 2019**). Cette valeur est supérieure à celle trouvée pour les ferments libres de 70°D.

Mais, dans les deux cas les valeurs d'acidité sont comprises dans l'intervalle donné par **Romain et al., (2008)**, soit 70 à 80 ° D pour les yaourts fermes.

L'observation de l'allure de deux courbes dans les deux cas montre qu'il y a une relation inversement proportionnel entre le pouvoir acidifiant et le pouvoir de dégradation du lactose.

Le lactose sucre naturellement présent dans le lait est le substrat que les bactéries lactiques utilisent comme nutriment principal en particulier *S.thermophilus* dont la croissance précède celle de *L.bulgaricus* dans la symbiose du yaourt. L'acide lactique est le résultat de cette fermentation diminue le pH du lait entraînant des modifications de conformation des protéines laitières et leur précipitation, et donc la texturisation et l'épaississement du lait. L'activité des bactéries lactiques en particulier *L.bulgaricus*, transforme également d'autres composés présents dans le lait : les produits de fermentation jouent un rôle important dans l'arome des différents laits fermentés (**Bourlioux , 2011**).

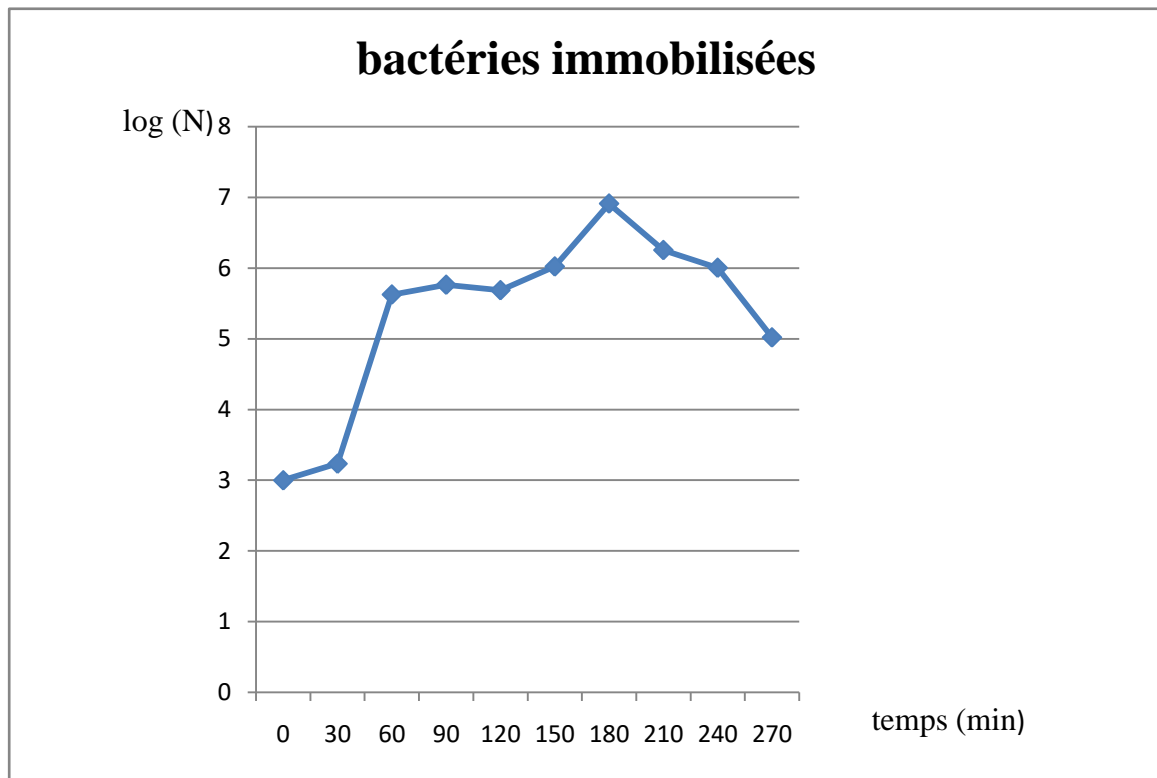
Dans les laits fermentés, particulièrement les yaourts, la cinétique d'acidification des deux espèces lactiques est d'évolution différente voir contradictoire ce trait est lié aux caractéristiques physiologiques, biochimiques des deux espèces lactiques utilisées *Streptococcus thermophilus* ayant une vitesse élevée d'acidification (**Merbai et al., 2010**).

Cette espèce est victime d'abaissement du pH contrairement à *Lactobacillus bulgaricus* ayant un pH optimum de croissance au tour de 04,90 (espèce acidotolérante) (Angelov et al., 2009).

## 3.2. Paramètres microbiologiques

### 3.2.1. Croissance bactérienne

Les résultats donnés par Loukrif et al., (2019), ont représenté l'évolution des bactéries immobilisées et libres en fonction du temps est présentée dans La figure.



*Figure 12 : Croissance des ferments lactiques immobilisés dans le yaourt ferme.*

Elles ont remarqué que les 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 formation d'un biofilm.



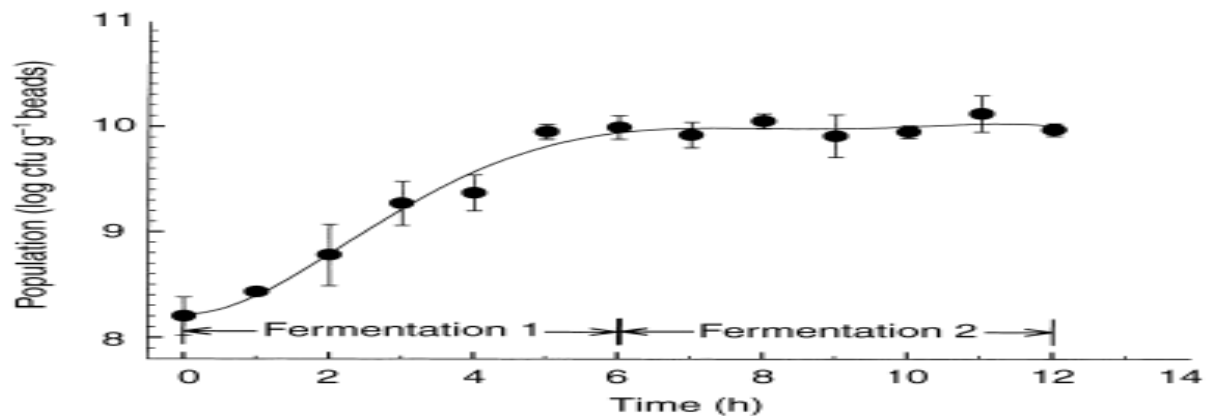
#### 4. Représentation des articles

Pour l'étude de l'immobilisation on a fait une synthèse des travaux précédents : sur l'immobilisation des cultures lyophilisées à alginates de *Streptococcus thermophilus* et comparer les activités acidifiantes de ces cultures réhydratées avec des inoculants liquide libres, l'immobilisation des bactéries lactiques par des particules argileuses (Bentonites de Maghnia), la modélisation de la fermentation par la fixation de l'acide lactique par l'argile anionique et la sélection des paramètres d'opération favorables pour obtenir une qualité élevée de yaourt, les facteurs affectant l'adsorption des cellules microbiennes.

##### 4.1 Les résultats de l'article de Champagne *et al.*, (2000).

- Cette étude consiste à préparer des cultures lyophilisées immobilisées à l'alginate de *Str.thermophilus* et comparer les activités acidifiantes de ces cultures réhydratées avec des inoculants liquides classiques pour culture libre.

La Figure13 représente la croissance de *Streptococcus thermophilus* BT1 dans des billes d'alginate à 37 °C.

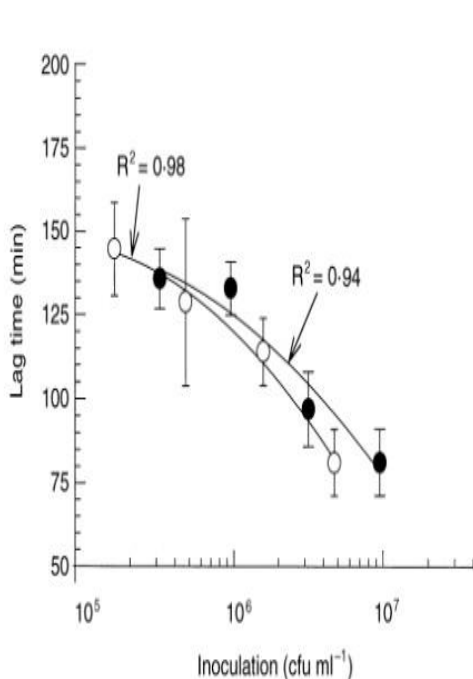


**Figure13** : Croissance de *Streptococcus thermophilus* BT1 dans des billes d'alginate à 37 °C.

Croissance de *Str. thermophilus* BT1 était visible dans d'alginate et la population atteignait  $10^{10}$  UFC/g après 6h d'incubation. Une incubation supplémentaire 3h n'a pas augmenté la population. Ainsi, ils ont récupéré les billes et ré-inoculée dans le lait frais avec

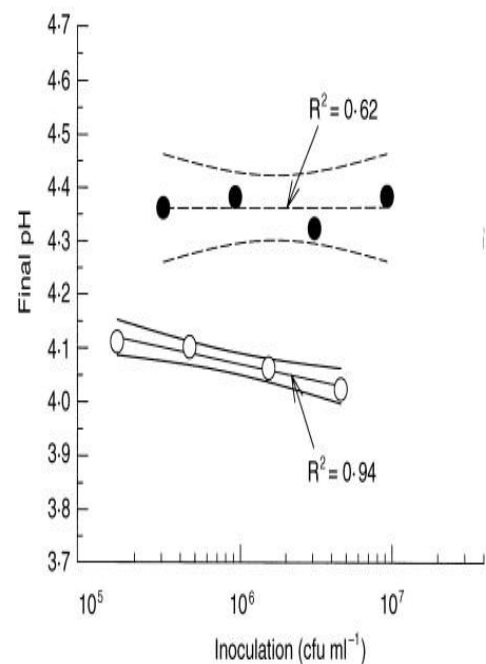
encore 6h d'incubation cela n'a pas amélioré le niveau de biomasse (Figure13). L'extension de l'incubation à 42°C/24h a provoqué une mort significative car aux cours de la sur-incubation des cultures dans l'acide lactique peut s'avérer toxique.

Les Figure 14 et 15 donnent Influence de temps de latence et le pH final en fonction de niveau d'inoculation.



**Figure 14 :** Influence de temps de latence en fonction de niveau d'inoculation.

- Culture cellulaire libre
- Technologie des cellules immobilisées



**Figure 15:** Influence du pH final en fonction de niveau d'inoculation.

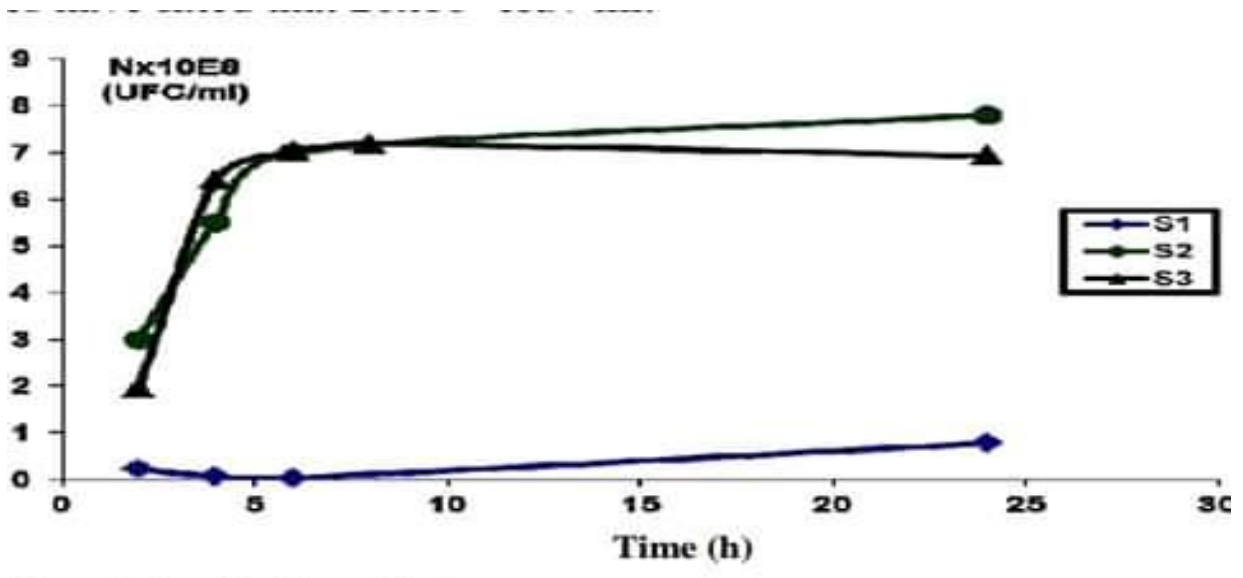
Ils ont indiqué une courbe d'acidification des cellules immobilisées similaire dans la fabrication du fromage à celle d'une culture cellulaire libre du lait classique sauf les valeurs de pH finales inférieures des TCI par rapport les cultures libres, cette différence n'est pas importante. Il y a des effets significatif du niveau d'inoculation sur le temps de latence (figure14), le taux d'acidification maximum et sur le pH ou moment auxquels le taux d'acidification est plus élevée (figure 15).

L'inconvénient principale de cette approche est le coût et nécessite des travaux sur l'effet de la réduction des tailles des billes alginate.

#### 4.2 Les résultats de l'article de Moulay et al., (2016)

- Le but de cet article est de tester d'habilité de l'association des bactéries lactiques (*Lactococcus diacetylactis*, *Lactobacillus fermentum* et *Streptococcus thermophilus*) par des particules argileuses.

Figure 16 indique les courbes de croissance des souches bactériennes en fonction du temps dans le culot : *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*.



**Figure 16 :** Courbes de croissance des souches bactériennes S1, S2 et S3 en fonction du temps dans le culot

S1 : *Lactobacillus fermentum*

S2 : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

S3 : *Streptococcus thermophilus*.

L'augmentation du nombre de cellules bactériennes immobilisées sur les particules argileuses sont montrées dans la figure 16, indiquant qu'après 4h d'incubation, l'argile est fixé les souches *Lactococcus diacetylactis* et *Streptococcus thermophilus* jusqu'à  $72 \times 10^7$  et  $70 \times 10^7$  UFC/ml respectivement.

Alors que pour les souches *Lactobacillus fermentum* a un nombre de  $20 \times 10^6$  UFC/ml.

Ils ont même observé une forte augmentation de la croissance des *Lactococcus diacetylactis* jusqu'à  $85 \times 10^7$  UFC/ml après 16h d'incubation qui indiquant que l'argile a un rôle catalytique.

Selon **Dommergues et Mangenot (1970)**, les particules argileuses en suspension ont des charges négatives, mais à la fin de leurs feuilles fiscaux apparaissent des charges positives. Par conséquent, il est possible d'adhésion entre les cellules microbiennes et les particules argileuses dues à des forces électrostatiques.

L'adhésion bactérienne par un support se fait par deux étapes : la première étape est physique, instantanée et réversible, la deuxième étape lie à la physiologie de la bactérie.

### 4.3 Les résultats de l'article de Vasilica et al., (2014)

Tableau indique influence des variables expérimentales de températures et rapport argile / lait sur la cinétique du processus de fermentation.

**Tableau 07** : influence des variables expérimentales sur la cinétique du processus de fermentation.

Courir	$\nu$ kHz	$t$ °C	$R$ g/L	$\tau^f$ min	$\Delta \tau^{\max}$ min	$\nu^g \cdot 10^z$ g/(L·min)	$\gamma^{LA, \min}$ g/L	$s^{LA, eq}$ g/g	$k^{LA}$ cm/min
1	0	38	0	220	70	1,716	-	-	0,0000
2	0	38	1	250	90	1,716	4,696	0,225	0,0047
3	0	38	5	260	110	1,716	4,005	0,194	0,0020
4	0	38	7,5	280	120	1,716	3,811	0,171	0,0018
5	0	43	0	210	70	1,722	-	-	0,0000
6	0	43	1	220	80	1,722	4,923	0,243	0,0049
7	0	43	5	250	110	1,722	4,319	0,210	0,0021
8	0	43	7,5	260	120	1,722	4,027	0,310	0,0019
9	0	48	0	160	70	1,788	-	-	0,0000
dix	0	48	1	180	90	1,788	4,902	0,270	0,0054
11	0	48	5	210	120	1,788	4,265	0,228	0,0023
12	0	48	7,5	220	140	1,788	3,937	0,204	0,0020
13	35	38	0	240	80	1,584	-	-	0,0000
14	35	38	1	260	100	1,584	4,562	0,350	0,0073
15	35	38	5	270	120	1,584	3,893	0,220	0,0023
16	35	38	7,5	290	130	1,584	3,660	0,190	0,0020
17	35	43	0	220	70	1,590	-	-	0,0000
18	35	43	1	240	90	1,590	4,777	0,374	0,0075
19	35	43	5	260	120	1,590	3,982	0,264	0,0026
20	35	43	7,5	280	130	1,590	3,750	0,216	0,0022
21	35	48	0	180	80	1,638	-	-	0,0000
22	35	48	1	200	100	1,638	4,773	0,383	0,0077
23	35	48	5	230	130	1,638	4,050	0,270	0,0027
24	35	48	7,5	240	150	1,638	3,675	0,252	0,0025

$R = m$  (argile) /  $V$  (lait);  $\tau^f$  = temps de fermentation finale;  $\Delta \tau^{\max}$  = période de croissance cellulaire maximale;  $\nu^g$  = taux de génération d'acide lactique (LA);  $\gamma^{LA, \min}$  = concentration minimale en LA dans la phase liquide en présence d'argile anionique;  $s^{LA, eq}$  = concentration d'équilibre en LA dans la phase solide;  $k^{LA}$  = coefficient de transfert de masse dans le film liquide

Par conséquent à partir des expériences menés dans les différentes conditions opératoires ont résumé dans le tableau 07 (essais 1 à 24), ils ont trouvé seules huit essais (2, 3, 6, 7, 14, 15, 18, 19) sont favorables pour obtenir un yaourt de meilleur qualité à faible coût, caractérisée par des valeurs maximales de viscosité dynamique (0,155pa.s) et de concentration de LAB viable ( $N=1,58 \cdot 10^7$  UFC/g, un indice de synérèse minimale ( $S=22,37\%$ ) et un coagulum crémeux à été obtenu à  $t = 43$  C° et  $R= 5$ g/l. la présence des particules d'argile anionique retiennent le LA produit dans le milieu de fermentation et réduisent son effet inhibiteur sur la croissance du LAB, tandis que le champ ultrasonique intensifie le processus de rétention du LA en diminuant l'épaisseur de la couche limite et en augmentant le taux de transfert de masse.

D'après **Suzana et al., (2013)**, l'ensemble des facteurs affectant l'adsorption des cellules microbiennes :

- ✓ L'âge et le stade physiologiques des cellules ;
- ✓ La structure de la bactérie (flagelle et autres appendice) ;
- ✓ La composition de milieu : son pH et les conditions environnementales ;
- ✓ Les propriétés de surface et la taille des adsorbants affectent également le processus de l'immobilisation ;
- ✓ Les adsorbants inorganiques sont résistants à la dégradation biologique, sont abordables et peuvent être facilement régénéré, mais ils sont solubles dans les milieux alcalines.

# **Conclusion**

## Conclusion

Toute entreprise de transformation alimentaire a un objectif premier de mener à bien ses étapes de fabrication afin d'obtenir un produit respectant les critères de qualité microbiologique, physico-chimique et sensorielle.

Notre étude a porté sur l'isolement de l'espèce *Streptococcus thermophilus* à partir de yaourts nature (SOMMAM et HODNA) et les immobiliser par un support argileux (bentonite de Maghnia) pour la fabrication d'un yaourt ferme.

Les résultats de l'identification révèlent que les Streptocoques forment des petites colonies blanchâtres, sphériques. Elles sont des Gram positif, disposées en chainettes et à catalase négatif et homofermentaire.

L'étude de la croissance bactérienne et les analyses physico-chimiques montre que l'acidité Dornic augmente proportionnellement avec le nombre des bactéries alors que le pH qui diminué est inversement proportionnel à l'évolution de nombre des bactéries.

Dans l'étude de l'article de **Champagne et al., (2000)** qui préparent des cultures lyophilisées immobilisées de *Streptococcus thermophilus* à l'alginate ils ont trouvé une population à atteindre  $10^{10}$  UFC/g après 6h d'incubation dans des billes alginates et ces cultures avaient une courbe d'acidification similaire à celle d'une culture des cellules libres dans liquide classique à l'exception des valeurs de pH finale au cours de la production de fromage. Par conséquent, cette étude démontre une approche réussie pour augmenter l'activité acidifiante par ces cultures immobilisées mais des travaux supplémentaires sont nécessaires sur l'effet de la réduction de la taille des billes sur la texture et les propriétés de protection contre les phages.

Concernant l'étude de **Moulay et al., (2016)**, ils ont montré la capacité des bactéries lactiques d'adhérer avec des particules argileuses de type Bentonite (Maghnia) par la formation d'un biofilm. Les particules argileuses immobilisant mieux *Lactococcus diacetylactis* et *Streptococcus thermophilus* jusqu'à  $72 \times 10^7$  et  $70 \times 10^7$  UFC/ml respectivement et *Lactobacillus fermentum* elles n'ont fixés que  $40 \times 10^6$  UFC/ml, alors ils ont indiqués que l'argile a un rôle catalytique.

Dans une autre étude sur la modélisation de la fermentation par la fixation de l'acide lactique par l'argile anionique : **Vasilika et al., (2014)**, ils se montrent la meilleure qualité de yaourt à faible coût caractérisée par une viscosité maximale et un nombre LAB viable et un indice de synérèse minimale et un coagulum crémeux a été obtenu à :  $t = 43\text{ C}^\circ$  et  $R = 5\text{ g/l}$  en raison d'une teneur élevée en LAB viable et de la présence d'argile aux propriétés antiacides ce produit peut avoir des avantages significatifs pour la santé .

Cette étude mérite d'être reprise et approfondie par des travaux complémentaires afin de confirmer l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées dans l'industrie laitière





# **Références bibliographiques**

-A-

- ❖ **Ait Hmeid H., Akodad M., Aalaoul M., Baghour M., Moumen A., Skalli A., Anjjar A., Conti P., Ryazi Khyabani F., Mnucci S., Daoudi L. (2020).** Clay mineralogy, chemical and geotechnical characterization of bentonite from Beni Bou Ifrou Massif (The Eastern Rif-Morocco). *Geological Society, London, Special Publications* 502.
- ❖ **Angelov M., Kostov G., Simova E., Beshkova D., Petia koprinkova-Hristova P. (2009).** Protocooperation factors in yogurt starter cultures. *Revue de Génie industriel* 3,5-12.
- ❖ **Anses (2008).** Composition nutritionnelle des aliments. Table ciqual.

-B-

- ❖ **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjeme., Henni DE., Kihal M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21 :579-588.
- ❖ **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.
- ❖ **Béal C., Helinck S. (2019).** Fabrication des yaourts et « des laits fermentés» F6315v2.
- ❖ **Begloul L. (20011).** Application des analyses physico-chimique et microbiologiques au niveau des laboratoires de la laiterie Â «Sidi Saada Â» en Algérie. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaghanem-Rapport de stage.P14.
- ❖ **Belmokhtar F., Garadi FM., Koudria H. (2019).** Comparaison entre deux types de yaourt obtenus à partir de deux souches isolées localement et lyophilisées, Mémoire de Master .Université Ibn-Khaldoun-Tiaret, Pp 11,12.
- ❖ **Bourlioux P., Braesco V., Denis DG Mater. (2011).**"Yaourts et autres laits fermentés." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 46.6 p305-314.
- ❖ **Bulard F. (2012).** L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire, Thèse de Doctorat .Université Paris –Sud, Paris. P185.

-C-

- ❖ **Champagne CP., Gardner NJ., Soullignac L., Innocent JP. (2000).** The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 124-131.
- ❖ **Corrieu G et Luquet Françoise-Marie. (2008).** Bactéries lactiques . De la génétique aux ferments. Ed : Lavoisier, P511.

-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.
- ❖ **Delarras C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Ed : Lavoisier, 772p.
- ❖ **Dellaglio F., De Roissant H., Torrain S., Curk C., Janssen D. (1994).** Caractérisation générales des bactéries lactiques. In : de Roissant H et Luquet FM, Bactéries lactiques : Aspect fondamentaux et technologiques. Ed : Uriage, France : Lorica, Vol.1 : 25-116.
- ❖ **Doleyres Y. (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. thèse de doctorat. Université Laval QUEBEC. p 15.
- ❖ **Dommergues et Mangenot, (1970).** Ecologie microbienne du sol. Ed Masson, Paris.
- ❖ **Doucet R. (2006).** Le climat et les sols agricoles, science agricole Frances. 443p.
- ❖ **Dilmi-bouras A et Sadoun D. (2002).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait* 82 .p 247.
- ❖ **Dudez P., Francois M., Raiffaud C. (2017).** Transformer les produits laitiers frais à la ferme : 3<sup>e</sup> édition mise à jour, Ed : Educagri Editions, Pp 27-43.

## Références bibliographiques

---

~~-F-~~

- ❖ **Federlghi M. (2005).** Bactériologie alimentaire-comprenduim d'hygiène des aliments 2éme édition 219p.
- ❖ **François H. (2016).** L'argile, son utilisation à l'officine, Thèse de Doctorat. Université Angers.127p.
- ❖ **Fredot É. (2009).** Connaissance des aliments bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. édition TEC & DOC lavoisier France Paris. p31.

~~-G-~~

- ❖ **Guiraud J-P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique d'analyses microbiologiques. Ed : Dunod. 652p.
- ❖ **Guiraud J-P. (2003).** Méthodes d'analyse en microbiologie alimentaire. In : Microbiologie alimentaire, Ed : Dunod, Paris umentations pédagogiques d'Aquitiane polytechnique. 696p.
- ❖ **Guiraud JP et Rose JP. (2004).** Pratique des normes en biologie alimentaire. Ed : AFNOR, Paris. 279p.
- ❖ **Guillouard L., Lim E-M., Van De Guhte M., Grimaldi C., Penaud S et Maguin E. (2004).** Tolérance et réponse adaptative au stress aide chez *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Lait 84 (2004).p02.
- ❖ **Grumezescu AM et Holban MH. (2019).** Value- Added Ingredients and Enrichments of Beverages. Pp173-204.

~~-H-~~

- ❖ **Hadj Said M., Moulay M., Benbeguara M., Hocine L. (2019).** Preparation of a biosorbent (clay particles/streptococcus thermophilus) to treat polluted water with methylene blue. Advances in Environmental Biology.13(08) : 30-38.
- ❖ **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Crossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Gue don E., Monnet V.,Renault P., Kleerebezem M. ( 2005).** New insight in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomic. FEMS Microbiol. Rev., 29: Pp 435-463.

## Références bibliographiques

---

-I-

- ❖ **Ibrahim M., Briandet R., Mistou M., Chrétien A., Tremblay J et Kulakauskas S. (2004).** Immobilisation des lactocoques. Lait 84.p 103.

-J-

- ❖ **Joffin J et Leyral G. (2006).** Microbiologie Technique 4<sup>ième</sup> édition, centre régional de Documentation pédagogique d'Aquitaine.Polytechniques.

-K-

- ❖ **KASSA KS., Ahounou S., Dayo GK., Salifou C., Issifo MT., Dotche I., Youssa OI.AK. (2016).** Performances de production laitière des races bovines de l'Afrique de l'Ouest. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(5), 2316-2330.
- ❖ **Kouloughlis K. (2007).** Etude expérimentale des mélanges sable bentonite -Leurs performance comme barrière de confinement dans les CET, Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine.

-L-

- ❖ **Labioui H., Elmouldi L., El Yachioui M., Ouhssine M. (2005).**Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux, 144(3/4), Pp237.
- ❖ **Lamontagne M. (2002).** Produits laitiers fermentés, In science et technologie du lait : transformation du lait, chapitre8 Vignola C. I, Ed presses internationales polytechnique
- ❖ **Leprince C. (2007).** Les métiers de la biologie et de biotechnologie. Ed : Editions de l'Etudiant, Vol.515, P63.
- ❖ **Loukrif Soadia Wafaa, Mahnoun Khadidja, Mahouz Khiera. (2019),** Effet de l'immobilisation des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus*

*bulgaricus*) par des particules argileuses sur les qualités du yaourt, Mémoire de Master Université Ibn-khaldoun Tiaret, P15, 25, 27.

-M-

- ❖ **Macori G et Cotter PD. (2018).** Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Current Opinion in Biotechnology* Vol. 49: Pp 172-178.
- ❖ **Mahaut M., Romain J., Schuck P., Gérard B. (2000).** Les produits industriels laitiers. Ed: Tec&Doc.178p.
- ❖ **Majdi A. (2008).** Stage au centre professionnel d'agroalimentaire de cité EL KHADRA Mémoire online institut national agroalimentaire Tunisie –3ème année cycle ingénieur.
- ❖ **Marty-Teyssset C., Delatorre F., Garel J-P. (2000).** Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbruiikii* subsp *.bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH Oxidase in oxidative stress. *Applied and environmental microbiology* .66 (1): 262-26.
- ❖ **Meribai A., Ait-Abdeslam A., Krantar K., Mahi M., Benzeguir FM., Slimane N., Maghnia D., Mouadene R., Bensoltane A. (2010).** Biotechnologie study of a thermophilic acid starter from algerian cow's raw milk. *Egypt. Jo. Of Appl. Sci*, 25(4B), P 243-254.
- ❖ **Mohellebi F., Bouchekhou A., Harbi N., Hadjoudj R., Chiteur CE. (1999).** Etude de la purification d'huiles usages de type «moteur» au moyen d'une argile montmorillonitique. *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP*, Vol.54, No.3, Pp. 403-418.
- ❖ **Moulay M., Hadj Said A., Houssine L., Kihal M. (2016).** Immobilization Of Acid Lactic Bacteria On Bentonite Clay Particles of Maghnia Region West-Algrrien. *Advences In Envirenmental Biology*, 10(10), Pp 33-39
- ❖ **Moussa AI., Sobeih AMK., AL-Hawary II., Elkassas WM., Barakat R. (2020).** Efficacy of Kaolin and Bentonite Clay to Reduce Aflatoxin M1 Content in Contaminated Milk and Effects on Milk Quality. *Pakistan Veterinary Journal* 40(2) : Pp181-186

## Références bibliographiques

---

- ❖ **Multon J., Temple H., Viruega., J. (2013).** Traité de droit alimentaire français européen et international, Ed : Lavoisier, P 864.

-P-

- ❖ **Priyanka S et Prakash A. (2009).** Screening of lactic acid bacteria for antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* isolated from milk products at Agra region." *Internet Journal of Food Safety* 11 P 82.

-R-

- ❖ **Ragot M. (2011).** Produire du lait biologique : conversion et témoignages. Ed : Educagri Editions, P200.
- ❖ **Ramakrichna SV et Prakacha RS. (1999).** Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr Sci.* 77 :87-100
- ❖ **Romain J., Thomas C., Mahaut M., Schuck P., Gréard B. (2008).** Les produits laitiers 2<sup>ème</sup> édition. TEC& DOC Lavoisier. Paris France.

-S-

- ❖ **Srairi MT., Chatellier V., Corniaux C., Faye B., Aubron C., Hostiou N., Safa A., Bouhallab S., Lortal S. (2019).** Réflexions sur le développement du secteur laitiers et sa durabilité dans différentes parties du monde. *INRA Productions Animals*, 32(3) : Pp339-358.
- ❖ **Suzana CSM., Claudia MM., Larissa MCGF., Sandra TS. (2013).** Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African journal of Biotechnology*, Vol. 12 (28): Pp 4412-4418.
- ❖ **Savadogo 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.



-r-

- ❖ **Tamine AY et Robinson RK. (2007).** Yogurt: science and technogy CRC press, Boca Rarton,FL.
- ❖ **Tariket A. (2016).** Caractérisation du babeurre et son utilisation dans la fabrication d'un yaourt étuvé. Mémoire de Master Boumeardas, p 37.

-r-

- ❖ **Vasilika AA., Cosmin J., Ileana DN., Gabriela I. (2014).**Ultrasound intensification of Lactic fermentation process in the presence of anionic clays.REV. CHIM. ( Bucharest).65.No.8.
- ❖ **Vignola CL (2002).** Technologie du lait transformation du lait fondation de technologie laitière presse internationales polytechnique, 600p.
- ❖ **Vos P., Garrity G., Jones D., Kriej N., Ludwing W., Rainy F., Schleifer K., Whitman W. (2011).** Bergey's Manuel of systematic bacteriology. Volume 3: the Firmicute, 1450p.

-w-

- ❖ **Wang JS.,Luo H., Billam M., et al., 2005.** Short term safety evaluation of processed calc montmorillonite clay (NovaSil) in humans. Food Addit Contam 22 : 270-9.

-r-

- ❖ **Yildiz F. (2010).** Developpement and manufacture of yougurt and other dairy products, CRC press tay /05§ fra

-z-

- ❖ **Zoltan Adamis., IPC., Richard B. Williams., Jozef Fodor.,International Labour Organisation., United Nations Environnement Programme.(2005).Bentonite, Koalin, and Selected Clay Minerals, Ed :Word Health Organisation, vol 231, P160.**

# **Annexes**

## Annexe 01

### Composition des différents milieux de cultures utilisés

#### ➤ Gélose M17

Sodiuim glyérophosphate	19g
Soy peptone	05g
Beef Extract	05g
Lactose	05g
MeatPeptone	2,5g
CaseinPeptone	2,5g
Yeast Extract	2,5g
Ascorbic Acid	0,5g
Maghnesium Sulfate	0,25g
Bacteriological agar	12,75g

#### ➤ Gélose MRS

Dextrose	20g
Bacteriological Peptone	10g
Beef Extract	04g
Dipotassium Phosphate	02g
Ammonium Citrate	02g
Tween 80	01g
Magnesium Sulfate	0,2g
Manganese Sulfate	0,05g
Bacteriological Agar	01g

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

Disodium Glycerophosphate	19g
Tryptone	05g
Soy peptone	05g
Beef Extract	05g
Yeast Extract	05g
Ascorbic Acid	0,5g
Magnesium sulfate	0,25g

➤ **Milieu MRS Bouillon (Man Rogosa et Sharpe)**

Dextrose	20g
Bacteriological peptone	10g
Beef Extract	08g
Sodium acetate	05g
Yeast extract	04g
Dipotassium phosphate	02g
Magnesium sulfate	0,2g
Manganese sulfate	0,05g

## Annexe 02

### Coloration de Gram

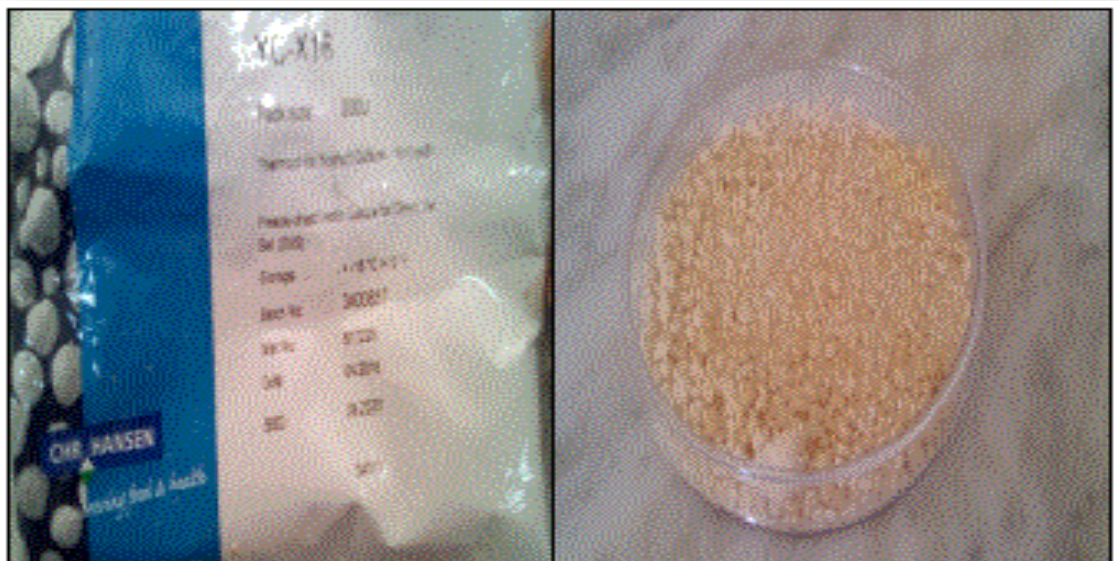
La coloration de Gram a été effectuée par les étapes suivantes :

- ✓ Stérilisation de la lame de microscope ;
- ✓ Place l'échantillon sur la lame ; dépose quelques gouttes de l'eau distillée sur la lame puis à l'aide de l'anse d'inoculation prélever des bactéries cultivées en boîte pétri et mélangé dans la goutte d'eau ;
- ✓ Fixation de la bactérie : fixation à la chaleur par le passage de la lame dans la flamme de bec bunsen deux ou trois fois ;
- ✓ Place la lame sur un bac de coloration ;
- ✓ Verser du cristal violet sur la lame préparée (pendant 30/60 seconde) ;
- ✓ Rincer doucement le cristal violet à l'aide de l'eau distillée ;
- ✓ Recouvrir le frottis d'iode sous forme de solution de lugol 1min pour le mordantage et puis le rinçage ;
- ✓ La décoloration par l'ajout de l'alcool quelques secondes rinçage obligatoire et rapide ;
- ✓ Verser une coloration sur le frottis ; la safranine ou la fuchine pendant 1min ;
- ✓ Séchage de la lame ;
- ✓ Analyser la coloration ; par une observation microscopique à l'aide de l'huile d'immersion (Gram + couleur violette, Gram- couleur rose).

### Annexe 03



**Photo 01** : les échantillons



**Photo 02** : Souches lyophilisées

## Annexe 04

### Cinétique des paramètres physico-chimiques et de croissance bactérienne immobilisées (Loukrif et *al.*, 2019).

**Tableau 10 :** Les valeurs de la variation de pH en fonction du temps.

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

**Tableau 11 :** Les valeurs de l'acidité en fonction du temps.

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

### Cinétique des paramètres physico-chimiques de yaourt étuvé

(Majdi, 2008)

**Tableau 12:** Les valeurs de la variation de pH en fonction du temps

<b>Temps (Min)</b>	0	30	60	90	130	200	215	230	250	270
<b>pH</b>	6,4	6,35	6,35	6,3	6,2	5,35	5,25	4,8	4,75	4,75

**Tableau 13 :** Les valeurs de l'acidité en fonction du temps

<b>Temps (Min)</b>	0	30	60	90	130	200	215	230	250	270
<b>Acidité °D</b>	20	21	21	22	25	42	45	68	69	70



**Tableau 14 :** les valeurs de nombre de micro-spotsen fonction de temps.

<b>Temps (min)</b>	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
<b>Log n</b>	3	3.23 5	5.6253	5.7632	5.686	6.0213	6.91	6.2535	6.0032	5.019

## Résumé

Nous avons réalisé une étude sur l'effet de l'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* par des particules argileuses (bentonite de Maghina) sur les paramètres de coagulation du lait. En premiers lieu on a fait une étape d'isolement et purification de la souche à partir de yaourts nature de marque (SOUMMA /HOUDNA) et à partir des grains des souches lyophilisées. Puis, on a ré-identifié ces isolats par des tests morphologiques et biochimiques qui ont confirmé que ces dernières sont des couques à Gram positif, catalase négative et de type homofermentaire. Et la deuxième partie consiste à l'immobilisation de *S.thermophilus* pour distinguer leurs effets sur la cinétique des paramètres physico-chimiques et la croissance bactérienne.

L'étude de l'évolution bactérienne et l'acidité Dornic révèle que a une relation inversement proportionnel entre le pouvoir acidifiant et le pouvoir de dégradation du lactose l'évolution de la croissance bactérienne et aussi d'autre résultat montre que la courbe d'acidité des cultures immobilisées est similaire à celle des cultures libres. En outre le produit obtenu est de bonne qualité.

**Mots clés :** Bentonite, immobilisation, *Streptococcus thermophilus*, cinétique

## Astract

We conducted a study on the effect of immobilization of *Streptococcus thermophilus* on Bentonite Clay Particles of Maghnia on the coagulation parameters of milk. The first step was isolation of the strains from naturel yogourt (SOUMMAM and HODNA) and from the grains strains freeze-dried. Then, we re-identified these isolates by morphological and biochemical tests, which confirmed that they are Gram positive, catalase negative, homofermentative-type. And the second part consists in the immobilization of *S.thermophilus* to distinguish their effects on the kenitic from the physico-chemicals parameters and bacterial growth.

Study of bacterial evolution and acidity dornic reveals that has an inversely proportional relationship between acidity and pH and the evolution of bacterial growth. Other study shows that the acidity curve of immobilized cultures is similars to that o free cultures.

In addition, the product obtained is with good quality.

Keywords : Bentonite, immobilization, *Streptococcus thermophilus*, kenitic, parameters

## المخلص

لقد أجرينا دراسة حول تأثير *Streptococcus thermophilus* على الصلصال (بنتونيت مغنية) على معاملات تخثر الحليب، في تثبيت الخطوة الأولى قمنا بعزل و تنقية السلالة من الزبادي السادة نوع حضنه وصومام و من حبات السلالة المجففة ثم قمنا بإعادة تحديد السلالة عن طريق تجارب ميكروبيولوجية وكيميائية الحيوية التي اتضح من خلالها أن هته الأخيرة ايجابية الغرام على شكل مكورات عنقودية، كتلاز سالب، و نتيجة التخمير متجانسة.

و الجزء الثاني خصص لدراسة تأثير التثبيت على المعاملات الكيميائية الحيوية و نمو البكتيريا تكشف دراسة تطور البكتيريا و الحموضة دورنيك على وجود علاقة عكسية بينهما و بين تحليل اللكتوز.

كما اظهرت نتائج أخرى أن البكتيريا المثبتة و الحرة لهما نفس منحى الحموضة بالإضافة إلى المنتج الذي تم الحصول عليه دو نوعية جيدة .

الكلمات المفتاحية تثبيت بنتونيت، حركية، معاملات، *Streptococcus thermophilus*