



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: biotechnologie et protection des végétaux

Thème

Caractérisation physico- chimique et microbiologique des yaourts industriels collectés dans la willaya de Bordj Bou Arreridj : Evaluation *In vitro* des effets relatifs aux levains thermophiles

Présenté par :

**BELFODIL Asma
AMMAR AOUCHICHE Amel**

Devant le jury:

Univ: BBA.

Président: Dr Touati N

M.A.A Univ: BBA.

Encadrant: Mr Abdelmalek Meribai

M.C.B Univ: BBA.

Examineur :Mr Alili

Année universitaire: 2017/2018

Remerciements

Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir.

Ce travail est le fruit d'une aventure qui n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de nombreuses personnes qu'on tient à remercier ici.

*On remercie en premier lieu notre responsable de thèse, Mr.A. **Meribai.***

Merci de nous avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse et de nous avoir fait confiance pour travailler sur une thématique des plus intéressantes, où on a pu se familiariser avec différentes techniques de microbiologie et de biochimie. Vos précieux conseils nous ont permis d'avancer. On tient également à vous remercier pour votre soutien scientifique mais aussi moral et bien sûr pour tout ce que vous nous avez appris, surtout la rigueur.

Nos remerciements s'adressent aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail:

Président Touati N

- encadrant Miribai A,

- Docteur Alili,

On remercie également les membres des laboratoires de Microbiologie, Phytopathologie et Biochimie pour leur soutien, leur générosité et leur bonne ambiance.

Enfin, nous adressons nos vifs remerciements à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes **parents** :

Spéciale dédicace à l'esprit de mon père : **youcef** et Ma mère : **nabila**
Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux,

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

A ma sœur **imen** et à mes frères **imad eddin** et **walid**

A la famille **belfodil** et **boussam**

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

A tous mes enseignants:
Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A ma cher amis : **ammar aouchiche amel**
Et tous mes collègues
Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.



Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes **parents** :

Spéciale dédicace à l'esprit de mon père **hocine** et Ma mère : **massaouda**
Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux,

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

A ma sœur **imen** et à mes frères **ameur** et **abedlhak**

A la famille **Ammar aouchiche**

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

A tous mes enseignants:
Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A ma cher amis : **belfodil asma**

Et tous mes collègues

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.



Table des matières

Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction :	p1

Partie 01: Synthèse bibliographique

1-Définition de yaourt :	p3
2- Les différents types de yaourt :	p3
2-1- Le yaourt ferme :	p3
2-2- Le yaourt brassé :	p3
2-3- Le yaourt entier :	p4
2-4- Le yaourt nature :	p4
2-5- Le yaourt maigre :	p4
3- La fabrication du yaourt	p4
4-Probiotique et aliments fonctionnels : le concept	p6
5_ Définitions	p6
5.1. Probiotique	p6
5.2. Aliment fonctionnel	p7
6-Défauts et altérations du yaourt:	p7
7-Normes microbiologiques pour les yaourts	p11
8-Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt	p11
8.1. Activité protéolytique	p12
8.2. Activité aromatique	p12
8.3. Activité texturante	p13
9-l'espèce <i>Streptococcus thermophilus</i>	p13
9.1. La bactériologie	p13
9.2. Propriétés technologiques	p13
9.3. Propriété génétiques	p14
9.4. Production des bactériocines	p15
10-L'espèce <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	p15
10.1. Bactériologie	p15
10.2. Propriétés technologiques	p16
10.3. Propriétés génétiques	p16
10.4. Production des bactériocines	p16
11-Comportement associatif des deux souches	p16
12-Facteur influençant la proto-coopération des deux souches	p17

Partie 02: étude expérimentable

Chapitre I: matériel et méthodes

I . Matériel et Méthodes	p19
I -1-Matériels	p19
I . 1.1-Echantillonnage	p19
I .1.2-Origine des échantillons	p20
I - 2-Méthodes	p21
I .2.1-Analyses physico-chimiques du yaourt :.....	p21
I .2.2-Traitements statistiques des résultats d'analyses physico-chimiques :.....	p22
I .2.3-Analyses microbiologiques :	p22
I - 3-Exploration In Vitro d'antagonisme entre isolats lactiques et souches pathogènes :.....	p23
3.1- Revivification des souches indicatrices (pathogènes).....	p23
3.2- Revivification des souches lactiques thermophiles.....	p24
3.4-Mise en évidence de l'activité antagoniste.....	p24

Chapitre II: resultat et discussion

II - Résultats	p25
II -1-Résultats des analyses physico-chimiques	p25
II .1-1-PH :	p29
II .1-2-L'acidité :.....	p29
II .1-3-La viscosité :	p30
II .1-4-L'azote totale :	p31
II .1-5- Les protéines	p31
II - 2-Résultats des analyses microbiologiques	p32
II - 3-Résultats des dénombrements des levains lactiques thermophiles	p33
II - 4- Exploration In Vitro d'antagonisme entre isolats lactiques et souches pathogènes	p35
a-Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram positif.....	p35
b-Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram négatif.....	p36
c-Entre souches lactiques et souches pathogènes eucaryotes.....	p38
II - 5- Résultats d'activité antimicrobienne relative aux espèces <i>Streptocoques</i> thermophiles	p39
Conclusion :.....	p41
Perspectives	42
Références bibliographiques	
Les Annexes	

Résumé

L'objectif de l'étude est d'évaluer la qualité physico-chimique, bactériologique, et les charges en levains thermophiles pour 12 échantillons de yaourt industriel, collecté dans le marché de la wilaya de Bordj Bou Arreridj:

Sur 07 tests physico-chimiques et les dénombrements de 09 groupes microbiens.

Les résultats étaient respectivement : pH : (4,30- 5,30), acidité (85- 252), conductivité,(5,2-7,35), la viscosité (9,75- 13,50), densité (5,70- 1,25), l'azote totale (5,24- 3,22) et les protéines (31,67- 19,5).

Les analyses microbiologiques ont montré que l'ensemble des échantillons étaient conforme aux normes nationales

Les espèces *Streptococcus* spp prédominent l'ensemble des échantillons.

La réalisation des interactions d'antagonisme, ont donné des zones inhibitrices (ZI: en mm), oscillant entre (06 mm-19 mm), contre des souches cibles à Gram positif, entre (05- 10) mm contre celles à Gram négatif et entre (06 mm et 09 mm) pour les interactions contre les eucaryotes (*Candida albicans*).

Conclusion : l'étude a montré la conformité de l'ensemble de nos échantillons aux normes physico-chimiques et bactériologiques requises, avec une prédominance casi-totale des espèces *Streptococcus* Spp.

Cependant, l'antagonisme des levains thermophiles vis à vis des souches eucaryotes et procaryotes confirment leur profil probiotique.

Mots clés: Yaourt, Microbiologique, Physico-Chimique, Dénombrement, Antagonisme.

Abstract:

The objective of the study is to evaluate the physicochemical, bacteriological and thermophilic leavening loads for 12 samples of industrial yogurt collected in the market of the wilaya of Bordj Bou Arreridj:

Out of 07 physico-chemical tests and counts of 09 microbial groups.

The results were respectively: pH: (4,30-5,30), acidity (85-252), conductivity, (5,2-7,35), viscosity (9,75-1,3,50), density 5.70-1.25), total nitrogen (5.24-3.22) and proteins (31.67-19.5).

Microbiological analyzes showed that all samples were in compliance with national standards

Streptococcus spp species predominate in all samples.

The effect of the antagonistic interactions resulted in inhibitory zones (ZI: mm), oscillating between (06 mm -19 mm), against Gram-positive target strains, between (05-10 mm) against Gram-negative and between (06 mm and 09 mm) for interactions against eukaryotes (*Candida albicans*).

Conclusion: The study showed that all of our samples conformed to the physico-chemical and bacteriological standards required, with a casi-total predominance of *Streptococcus* Spp species.

However, the antagonism of thermophilic leavening to eukaryotic and prokaryotic strains confirms their probiotic profile.

Key words: Yogurt, Microbiological, Physical-chemical, Enumeration, Antagonism.

ملخص:

الهدف من الدراسة هو تقييم الجودة الفيزيوكيميائية لـ 12 عينة من الياغورت الصناعي الذي تم جمعه في سوق ولاية برج بوعريريج:

من أصل 07 الاختبارات الفيزيوكيميائية وعد 09 مجموعات الميكروبية. وكانت النتائج على التوالي: درجة الحموضة: (4,30-5,30)، الحموضة (85-252)، الناقلية (2,5-7,35)، اللزوجة (9.75-13.50)، الكثافة (1.25-5.70)، مجموع النيتروجين (3.22-5.24) والبروتينات (19.5-31.67).

وأظهرت التحاليل الميكروبيولوجية أن جميع العينات تمثل للمعايير الوطنية. تسود *streptococces* في جميع العينات.

وأدى تأثير التفاعلات العدائية مناطق مثبطة (ملم) تتأرجح بين (06 ملم - 19 ملم)، ضد السلالات المستهدفة موجبة الغرام، بين (05-10 ملم) ضد سالبة الغرام وبين (06 ملم و 09 ملم) للتفاعلات ضد حقيقيات النوى (*condidatalbicanas*).

الخلاصة: أظهرت الدراسة أن جميع عيناتنا مطابقة للمعايير الفيزيوكيميائية والبكتريولوجية المطلوبة، مع غلبة *streptococces*.

ومع ذلك، فإن الخمائر الحرارية ضد سلالات حقيقية النواة وغير حقيقية النواة، يؤكد مظهرهمالبروبيوتيكي. الكلمات المفتاحية: الياغورت، الميكروبيولوجية، الفيزيوكيميائية، العد، العدائية.

Liste des abriviations

Liste des abriviations

°C :	Degré celcius
Co₂ :	oxyde de carbone
°D:	degré Dornic
EPS :	Exopolysaccharide
g/ml/cm³	Gramme sur millilitre sur centimètre cube
GRAS :	Generally Recognized As Safe
Lb :	<i>Lactobacillus</i>
LNSP :	Laboratoire National de Santé Publique
Mpb :	million paire de base
St/th :	<i>Streptococcus thermophilus</i>
%:	pour cent.
°D:	degré Dornic.
µm:	micro mètre.
‰:	pour mille.
cm³:	centimètre cubique.
CO₂:	Dioxyde de carbone.
D:	Densité.
DLC:	Date limite de consommation.
EPS:	Exopolysaccharides.
g/l:	gramme par litre.
g:	gramme
GC:	Guanine Cytosine.
GRAS:	Generally Regarded As Safe.
H :	Heure.
Lb.:	<i>Lactobacillus.</i>
LER:	Lait écrémé reconstitué.
LFA :	Lait fermenté Acidifié
mg:	milligramme.
min:	minute.
ml:	millimètre.
N:	Normale.
Ntotale :	azote totale

Liste des abreviations

PCR : Polymérase Chain réaction

pH: potentiel d'hydrogène.

PrtS: Protéine.

S : second.

S : *Streptococcus*.

UFC: Unité Formant Colonie.

Y: Yaourt.

Z.I: Zone Inhibitrice.

Max : *Maximal*

Min : *Minimal*

Liste des figures

Liste des figures :

Figure 1 : Diagramme de fabrication du yaourt	p05
Figure 02 : histogramme représentatif des PHs des échantllons.....	p26
Figure 03 : histogramme représentatif des acidités (⁰ D) des échantllions.....	p27
Figure 04 : histogramme représentatif des conductivités des échantllions.....	p27
Figure 05 : histogramme représentatif des viscosités des échantllions.....	p28
Figure 06 : histogramme représentatif des densités des des échantllions.....	p28
Figure 07 : histogramme représentatif des N totales des des échantllions.....	p29
Figure 08 : histogramme représentatif des protéines des des échantllions.....	p29
Figure 09 : histogramme représentatif des flores dénombrées surM17.....	p34
Figure10 : histogramme représentatif des flores dénombrées surMRS.....	p35
Figure11 : Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches pathogènes à Gram ⁺	p37
Figure 12 :Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogènes à paroi Gram ⁺	p37
Figure 13 : Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches pathogènes à Gram ⁻	p38
Figure14 :Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogènes à paroi Gram ⁻	p38
Figure15 : Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches eucaryotesb(levure).....	p39
Figure16 : Illustration du pouvoir inhibiteur sur M.H (ø en mm) dirigé contre des souches eucaryotes(levure).....	p39

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau n01 : principaux défauts de goût (A), de texture (B) et d'apparence (C) rencontrés dans la fabrication des yaourts.....	p08-09
Tableau n02 : Normes microbiologiques pour les yaourts.....	p11
Tableau n03 :représentatif de l' Origine des échantillons.....	p20
Tableau n04 :représentatif des flores pathogènes.....	p21
Tableau n05 : Présentation (origine, Gram et conditions de réactivation) des souches pathogènes utilisées.....	p24
Tableau n 06 : résultats des analyses physico chimiques	p26
Tableau n 07 : résultats des analyses microbiologiques.....	p33
Tableau n 08 : illustrant résultats des dénombrements des flores caractéristiques du yaourt.....	p34
Tablea n09 : Diamètres en (mm) des zones d'inhibition (Z.I) obtenues avec des souches cibles pathogènes à Gram positif.....	p36
Tableau n10 :Antagonisme des(zones d'inhibition en mm) dirigé contre les souches pathogènesà Gram négatif.....	p38
Tableau n11 : Tableau représentatif des zones d'inhibition entre isolats lactiques et souches eucaryotes (levure).....	p39

Introduction :

Le yaourt étant d'origine turc, a fait son apparition en nutrition humaine à partir de l'année 1542. Ce produit avant de connaître une consommation de niveau industriel, n'était qu'un simple produit issu d'une fabrication traditionnelle par les crémeries ainsi que les producteurs de lait. C'est à partir du milieu du XXème siècle, que les industriels se sont mis à produire en masse des yaourts, diminuant ainsi son côté traditionnel. Aujourd'hui, le yaourt est considéré comme un produit de large consommation, car celui-ci est consommé par près de 90% des populations du monde. Le yaourt représente la moitié du marché de l'ultra-frais. (**Marcel et al., 2008**). Les industriels sont contraints de faire face à une demande de plus en plus exigeante et perpétuellement changeante.

Les processus de fabrication du yaourt, même si leur principe de base, demeure le même, sont complexes, en perpétuelle évolution, car, ils intègrent, à chaque fois, des nouvelles connaissances, les progrès, réalisés dans des domaines variés tels que: la Biologie moléculaire, la Biotechnologie, la chimie, la Biophysique (**Angelov et al., 2009**). En Algérie, le yaourt est fabriqué partiellement ou entièrement à base de lait en poudre (lait recombiné), de point de vue consistance du produit; ont distingué des yaourts brassés plus ou moins fluide, yaourt ferme (formation du gel des protéines sous l'action d'acidité) et à un degré moins des yaourts fluide (mousse) à boire.

Les bactéries lactiques, sont largement impliquées dans la fabrication de produits laitiers fermentés; tel que les yaourts, qui est obtenu par l'action des deux espèces bactériennes spécifiques à savoir : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, qui doivent êtreensemencées simultanément et se trouvées vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme du produit, à la date limite de consommation.

Avec les progrès technologiques réalisés ; le yaourt, apparaît comme un produit laitier très digeste, qui possède une, grande valeur nutritionnelle et qui est apprécié pour son goût et sa texture. C'est un produit consommé la plupart du temps comme un dessert, car il convient à toutes les tranches d'âge et même chez les sujets intolérants au lait. (**Schmidt et al, 1994**).

De plus, les bactéries lactiques jouent également un rôle essentiel dans la conservation et l'innocuité de ces aliments, par la production des acides organiques et d'autres composés antimicrobiens ; comme les bactériocines qui inhibent la croissance des germes pathogènes et/ ou de contamination.

Le consommateur, de plus en plus exigeant, est en droit d'attendre que les aliments qu'il consomme soient sans danger et propres à la consommation.

Les intoxications alimentaires et les maladies transmises par les aliments ; présente un réel danger. Mais elles ont aussi d'autres conséquences, à l'exemple de la détérioration des aliments, une source de gâchis et de perte économique. En plus ces pertes sont coûteuses et peuvent se répercuter négativement sur le commerce et la confiance de consommateur.

La production , à l'échelle industrielle du yaourt et sa conservation au froid, durant sa mise en vente, pose le problème de viabilité des ferments lactiques, des modifications touchant le pH, la concentration d'acide lactique, la rhéologie du produit, et par conséquent des modifications des caractéristiques gustatives (**Irkin et Eren,2008**), ce qui conduit à des défauts d'ordre organoleptique et hygiénique du produit par modification des nombres des flores lactiques viables finales (**Abdelmalek et al.,2009**) et la détérioration de la qualité hygiénique du produit (**Saint-Eve et al., 2008**).

Dans ce contexte précis, se situé le but de notre étude, ou nous avons fixé, comme objectif préalable, l'exploration de la qualité physico- chimique par réalisation de tests physico-chimiques(pH,acidité,conductivité,viscosité,densité,Ntotale,protéines)et microbiologique par recherche des flores et espèces contaminantes (Levures et moisissures, flores mésophiles aérobie totale, coliformes totaux et fecaux, *Streptococcus D*, *Clostridium* sulfito-réducteur, *Pseudomonas Sp* ,*Salmonella*, *Staphylococcus sp*) ainsi des dénombrement des flores lactiques thermophiles, caractéristiques du yaourt sur milieu sélectifs (*Lactobacillus* spp sur MRS et *Streptococcus thermophilus*sur M17), pour douze échantillons du yaourt, collectés du marché local dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj - Nord -Est d'Algerie

Le présent mémoire est repartit en deux chapitres, dont le premier est relatif à une synthèse bibliographique, alors que le second est consacré à la partie expérimentale.

Partie 01 :
Synthèse bibliographique

1-Définition de yaourt :

D'après le *Codex Alimentaires*, le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (*Lb. Bulgaricus*) et de *Streptococcus salivarius*, sous-espèce *thermophilus* (*St. Thermophilus*) à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition de substances (lait en poudre, poudre de lait écrémé, les protéines lactosériques concentrées ou non, la caséine alimentaire ...etc.). Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants.

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. Certains pays néanmoins admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation, le produit ne contienne plus de bactéries vivantes. Cette pratique n'est toutefois pas recommandable, car elle modifie les propriétés du yaourt.

2- Les différents types de yaourt :

2-1- Le yaourt ferme :

Le laitensemencé est versé dans de petits pots dans lesquels le yaourt sera commercialisé l'épaississement effectue donc dans les pots durant 3 à 5 heures lorsque le yaourt est suffisamment formé la fermentation peut être arrêtée par un refroidissement à +/-2°C

Des fruits peuvent avoir été ajoutés lors de la mise en pots ils doivent toutefois avoir été stérilisés pour éviter tout risque de fermentation parasite.

2-2- Le yaourt brassé :

Le laitensemencé est versé dans de grandes cuve en acier inoxydable ou il est maintenu à température d'incubation le yaourt est ensuite brassé ce qui le rend moins visqueux et plus onctueux le yaourt à boire est obtenu par homogénéisation après avoir été brassé il est battu dans des cuves avant d'être conditionné Des sirops pulpes de fruits et arômes sont souvent ajoutés lors de la mise en pots La fermentation est stoppé par refroidissement rapide et le yaourt est stocké au frais à moins de 7°C

Yaourt entier nature ou maigre la différence : la teneur en matière grasse ou par sa consistance

2-3- Le yaourt entier :

Comme sa dénomination indique ce yaourt est à base de lait entier sa teneur en mg est de 3,5 (35g/l) c'est un yaourt très onctueux et crémeux

2-4- Le yaourt nature :

Le plus fréquemment consommé il s'agit du yaourt fabriqué à partir de lait partiellement écrémé il contient 1 de mg (10g/l)

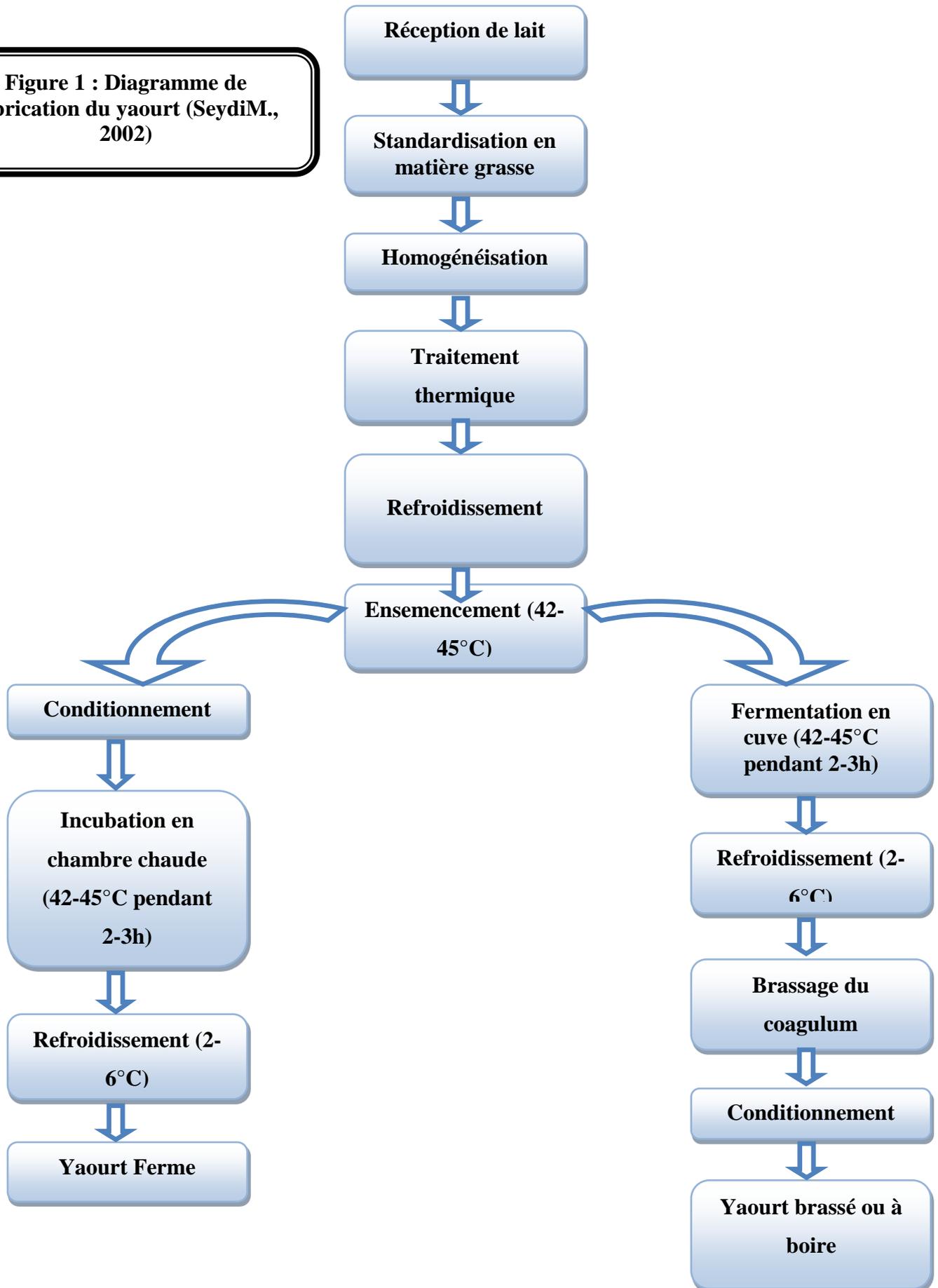
2-5- Le yaourt maigre :

Préparé à partir de lait écrémé il a une consistance gélifiée il est moins moelleux et il ne contient plus de vitamine A et D

3- La fabrication du yaourt

Le yaourt est un lait fermenté, préparé avec des laits écrémés ou stérilisés, éventuellement additionnés de poudre de lait (pour améliorer la consistance) etensemencés avec deux bactéries lactiques spécifiques qui sont *Streptococcus salivarius thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Au terme de la fermentation (à 45°C pendant environ 2h), le lait coagulé est devenu un yaourt contenant 100 millions de bactéries vivantes par gramme. C'est l'activité bactérienne qui confère au yaourt son arôme et son goût caractéristiques ainsi que ses qualités nutritionnelles spécifiques.

Figure 1 : Diagramme de fabrication du yaourt (SeydiM., 2002)



4-Probiotique et aliments fonctionnels : le concept

Aujourd'hui, un nombre croissant de consommateurs deviennent de plus en plus intéressés par leur santé personnelle et sont conscients du lien entre l'alimentation et la santé. Les crises sanitaires qui ont récemment secoué l'industrie alimentaire ont ébranlé la confiance des consommateurs dans certains produits transformés. Par conséquent, le marché des produits « naturels », « bio » ou encore « fonctionnels » a connu un essor remarquable étant donné que de plus en plus de consommateurs privilégient les aliments qui sont perçus comme étant capables de prévenir la maladie. Dans ce paysage et suite à l'apparition des maladies dites « *De civilisation* », la réflexion sur la préservation de la santé devient indissociable de la réflexion sur l'alimentation. En effet, l'alimentation est susceptible de moduler diverses fonctions de l'organisme, et peut aussi contribuer à diminuer le risque de certaines pathologies (Marcel *et al.*, 2008).

5_ Définitions

5.1. Probiotique

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui, 2006). Une des premières définitions des probiotiques comme « *facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes* » a été proposée par Lilly et Stillwell en 1965. Plus tard, Fuller propose une définition très proche du sens actuel : « *supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale* » (Fuller, 1989). Récemment, les probiotiques se définissent comme « *des cultures microbiennes vivantes sur vivant le transit gastro-intestinal, où elles colonisent le système* » (Saarela *et al.*, 2000; Matilla-Sandholm *et al.*, 2002; Betoret *et al.*, 2003). D'autre part selon Margolis et Garcia (2003), le terme probiotique se réfère à des « *cultures de microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à l'homme ou aux animaux (par le biais de cellules déshydratées ou des aliments fermentés), améliorent les propriétés de la microflore autochtone de l'hôte* ». Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (FAO/OMS, 2001) qui redéfinit les probiotiques comme « *des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation),*

Confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce groupe a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et / ou l'activité dans le corps humain (Leahy *et al.*, 2005).

5.2. Aliment fonctionnel

On dit d'un aliment qu'il est fonctionnel lorsqu'il a été clairement démontré qu'il affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme indépendamment des effets nutritionnels adéquats, en provoquant une amélioration de l'état de santé et du bien-être et/ou une réduction des risques d'apparition de maladies. Les aliments fonctionnels sont, comme leur nom l'indique, des aliments, et leurs effets doivent être perceptibles après leur ingestion en quantités normales. Il ne s'agit en aucun cas de capsules/gélules ou de comprimés, mais bien d'aliments (Izquierdo, 2009). En ce qui concerne l'aliment probiotique, il est défini comme un produit transformé qui contient

des microorganismes probiotiques viables en concentration appropriée dans une matrice alimentaire (Saxelin *et al.*, 2003). Cela signifie que la viabilité et l'activité métabolique doivent être maintenues à travers toutes les étapes de transformation des aliments, depuis leur fabrication

jusqu'à leur ingestion par le consommateur, et aussi qu'ils doivent être capables de survivre dans les voies gastro-intestinales de l'hôte (Sanz, 2007).

6-Défauts et altérations du yaourt:

Comme l'élaboration du yaourt fait intervenir plusieurs étapes clés où la fermentation et la formation du gel doivent être minutieusement dirigées et surveillées, il est fréquent que des altérations de goût, d'apparence et de texture (résumés dans le tableau I) apparaissent et dont certaines sont préjudiciables à la qualité finale du produit (Luquet, 1985).

Tableau n01: principaux défauts de goût (A), de texture (B) et d'apparence (C) rencontrés dans la fabrication des yaourts (LUQUET, 1985).

(A)

nature	Causes
Amertume	Trop longue conservation ; Activité protéolytique trop forte des ferments ; Contamination par des germes protéolytiques.
Goût levuré, fruité,	Contamination par des moisissures ; Fruits de mauvaises qualités pour les yaourts aux fruits.
Goût plat, absence d'arôme	Mauvaise activité des levains (déséquilibre de la flore, incubation trop courte ou à trop basse température), teneur en matière sèche trop faible.
Manque d'acidité	Mauvaise activité des levains (taux d'ensemencement trop faible, incubation trop courte ou à basse température, inhibiteurs dans le lait, bactériophages).
Trop d'acidité	Mauvaise conduite de la fermentation (taux d'ensemencement trop fort, incubation trop longue ou à température trop élevée ; Refroidissement pas assez poussé, trop lent ; Conservation à trop haute température.
Rancidité	Contamination par les germes lipolytiques et traitement thermique trop faible.
Goût farineux, de poudre	Poudrage trop poussé.
Goût oxydé	Mauvaise protection contre la lumière (pots en verre surtout) ; Présence de métaux (fer, cuivre)
Goût de cuit	Traitement thermique trop sévère.
Gout aigre	Mauvaise conduite des levains (contamination par une flore lactique sauvage – coliformes).
Goût gras	Teneur en matière grasse trop élevée.

(B)

nature	Causes
Déculottage	Agitation ou vibration pendant le transport faisant suite à un refroidissement mal conduit en chambre froide (pour le yaourt ferme).
Manque de fermeté (pour yaourt étuvé)	Ensemencement trop faible ; Mauvaise incubation (temps et ou température trop faible) ; Agitation avant complète coagulation ; Matière sèche trop faible.
Trop liquide (pour le yaourt brassé)	Brassage trop violent ; Mauvaise incubation (temps trop faible) ; Matière sèche trop faible ; Mauvais ferments (pas assez épaississants) ; Fruits ou arômes pas assez concentrés.
Trop filant	Mauvais ferment (trop filant) ; Température d'incubation trop faible.
Texture sableuse	Chauffage du lait trop important ; Homogénéisation à température trop élevée ; Poudrage trop fort ; Mauvais brassage ; Acidification irrégulière et trop faible.
Texture granuleuse	Mauvais brassage ; Teneur en matière grasse trop élevée ; Mauvais choix des ferments.

(C)

nature	Causes
Decantation, synérèse	Suracidification ou post acidification (mauvaise conduite de la fermentation) ; Température trop élevée pendant le stockage ; Conservation trop longue; Refroidissement trop faible ; Agitation trop poussée et admission exagérée d'air (pour le yaourt brassé) ; Mauvaise adjonction des fruits ou des pulpes de fruits Agitation des yaourts (yaourt ferme) ; Teneur en matière sèche
Production de gaz	Contamination par des levures et des coliformes.
Colonies en surface	Contamination par des levures et moisissures.
Couche de crème	Mauvaise ou absence d'homogénéisation.
Produit sur le couvercle	Mauvaise manutention.
Produit non homogénéisé	Mauvaise agitation (dans le cas des yaourts aux fruits).

7-Normes microbiologiques pour les yaourts

Le LNSP s'appuie sur les normes FASONORM basées sur les normes françaises. Ces normes servent d'appui au contrôle et sont utilisées pour l'application des lois et règlements relatifs au contrôle des aliments. Elles imposent aux industriels une dure contrainte mais constituent le gage d'assurance qualité hygiénique et commerciale des produits. Les normes microbiologiques portant sur les germes recherchés sont mentionnées dans le tableau ci-après.

Tableau n02: Normes microbiologiques pour les yaourts (LOMPO L et al., 2006)

GERMES	NORMES (UFC/ g)
Bactéries lactiques	< 10 ⁸
Coliformes totaux	<10
Coliformes thermo tolérants	<1
<i>E. coli</i>	<10

Pour Paramètres physico-chimiques du yaourt Lors de la vente, la quantité d'acide lactique libre contenue dans 100 g de yaourt ne doit pas être inférieure à 0,8g. De plus, le pH du yaourt doit être autour de 4

8-Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (SCHMIDT *et al*, 1994). Le métabolisme est du type homofermentaire (production exclusif de l'acide lactique)

L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Doronic (1°D = 0,1g/l d'acide lactique). Elle se situe entre 100 et 130 °D (LOONES, 1994).

L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit :

- il aide à déstabiliser les micelles de caséines, ce qui conduit à la formation du gel;
- il donne au yaourt son goût distinct et caractéristique, comme il contribue à la saveur et l'aromatisation du yaourt (TAMIME et ROBINSON, 1999 ; SINGH *et al*, 2006);
- intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (LEORY *et al*, 2002).

8.1. Activité protéolytique

Pour satisfaire leurs besoins en acides aminés, les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséine et de protéines sériques, leur système protéolytique est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases. *Lb. bulgaricus* possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire. Cette activité protéasique permet d'hydrolyser la caséine en polypeptide.

St. Thermophilus est considérée comme ayant une faible activité endopeptidasique. Elle dégrade les polypeptides par son activité exopeptidasique en acides aminés libres.

8.2. Activité aromatique

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés dans une fermentation de type hétéro fermentaire. Parmi ceux-ci, l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde, qui provient en grande partie de la thréonine, joue un rôle essentiel dans ces caractéristiques organoleptiques recherchées. La concentration optimale de ce métabolite est estimée à environ 10 ppm. Sa production, due principalement au lactobacille, est augmentée lorsque ce dernier est en association avec le streptocoque qui en élabore de faibles quantités.

L'acétaldéhyde peut provenir :

- du pyruvate, soit par action de la pyruvate décarboxylase ou par action de la pyruvate déshydrogénase (appelée aussi pyruvate formate lyase)
- de la Thréonine par l'action de la Thréoninealdolase.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat qui est dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne, etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Ceci résulte d'un choix avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (ANONYME, 1995).

Notons que la saveur caractéristique du yaourt, due à la production du diacétyl et de l'acétaldéhyde et qui est recherchée dans les produits type «nature», est en partie masquée dans les yaourts aromatisés.

8.3. Activité texturante

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui, en formant des filaments, limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt. L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (EPS) qui, selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composé de rhamnose, arabinose, et mannose (SCHMIDT *et al*, 1994).

Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*. Mais d'après TAMIME (1999), *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose à des rapports de 4/1/1

9-L'espèce Streptococcus thermophilus

9.1. La bactériologie

St. thermophilus est un coque à Gram positif, anaérobie facultatif, non mobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques. Elle est aussi résistante au chauffage à 60°C pendant 30 minutes. Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposés en chaînes de longueurs variables ou par paires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C et son métabolisme est du type homofermentaire.

9.2. Propriétés technologiques

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des probiotiques pour conférer de bonnes propriétés sensorielles au produit fini, tels que :

➤ ***Viabilité et stabilité des microorganismes :***

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10⁷ cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique de *Streptococcus thermophilus* ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (Izquierdo, 2009). De plus, les *Streptococcus thermophilus* devraient être viables sans se

multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit augmenter l'acidité (**Mattila-Sandholmet al., 2002**).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotique en grand nombre.

➤ **Propriété acidifiante**

La fonction acidifiante est la plus recherchée des bactéries lactiques qui a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Les conséquences d'ordre physicochimique et microbiologique sont récapitulées d'après la coagulation du lait, la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire, elle participe aux qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés et inhibe la croissance de microorganismes nuisibles.

9.3. Propriété génétiques

Les analyses comparatives des génomes ont montré que 80% des gènes de *S. thermophilus* sont des orthologues de gènes d'autres streptocoques, ce qui confirme bien la proximité génétique existant entre les différentes espèces de streptocoques. L'évolution de *S. thermophilus* par la perte de gènes notamment ceux reconnus comme importants pour le pouvoir pathogène de *S. pneumoniae* ou *S. pyogenes* est reflétée par la présence de ces gènes sous une forme non fonctionnelle (pseudogènes) ou par leur absence dans les génomes connus. Au final, la proportion relativement élevée (10-11%) des gènes de *S. thermophilus* correspondant à des pseudogènes, pourrait résulter de l'adaptation de *S. thermophilus* à l'environnement laitier. Ces pseudogènes sont, entre autres, homologues à des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, dans le transport et la régulation. Mais cette dégénérescence ne semble pas s'appliquer de la même façon à toutes les souches. Chez *S. thermophilus*, même si cette protéase est similaire à la protéase des streptocoques.

Pathogène elle n'a pas gardé la même fonction. Elle n'est pas associée à la virulence mais plutôt avec une croissance et un taux d'acidification du lait rapide grâce à l'hydrolyse des caséines du lait en apportant des peptides et acides aminés.

9.4. Production des bactériocines

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites entre-autres, les bactériocines qui sont des métabolites aux propriétés antibactériennes. Il s'agit de peptides ayant la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes. Les souches de *S. thermophilus* produisent des bactériocines connues sous le nom de thermophiline. Ces bactériocines sont thermostables et actives à différents pH contrairement à une bactériocine appelée la nisine (elle n'est pas utilisée dans les aliments acides). Les bactériocines issues de *S. thermophilus* sont considérées comme sécuritaires en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Seulement cinq (05) sur 347 bactériocines de différentes souches de *S. thermophilus* ont été caractérisées à savoir:

- a. Thermophiline A
- b. Thermophiline T, produite par des souches isolées du fromage
- c. Bactériocine de *S. thermophilus* 81 qui a un large spectre d'inhibition
- d. Bactériocine produite par la souche *S. thermophilus* Adria 91 L 580, isolée à partir d'un fromage à pâte dure inhibe le *Clostridium tyrobutyricum*.

10-L'espèce *Lactobacillus bulgaricus*

10.1. Bactériologie

Lb. Bulgaricus est un bacille Gram positif, immobile, aspérule, microaéroophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chaînettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Embden Meyerhof. Il est incapable de fermenter les pentoses. *Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en Magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42 °C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt. Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le système le plus efficace pour éliminer le peroxyde d'hydrogène est l'utilisation d'une enzyme, la catalase, dont les bactéries lactiques sont déficientes. Ces dernières possèdent plutôt une peroxydase (pseudo catalase) qui est moins efficace que la catalase. Comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont dites microaérophiles.

10.2. Propriétés technologiques

Les principales propriétés technologiques sont:

- *Lactobacillus bulgaricus* : bactérie à Gram positive faible concentration en GC
- Thermophile homofermentaire capable de produire 1,4 à 1,6 d'acide lactique
- Fermente le glucose, le galactose, le lactose et le fructose
- Responsable de la production d'acétaldéhyde (composé aromatique de yaourt par transformation de la thréonine).

10.3. Propriétés génétiques

L'espèce *Lactobacillus bulgaricus* possède un génome de petite taille qui contient 2 Mpb et elle a un nombre de plasmides situé entre 0 et 4 .

10.4 . Production des bactériocines

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites entre-autres, les bactériocines qui sont des métabolites aux propriétés antibactériennes. Il s'agit de peptides ayant la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes. Les souches de *Lb. bulgaricus* produisent des bactériocines. Ces bactériocines sont thermostables et actives à différents pH contrairement à une bactériocine appelée la nisine

(elle n'est pas utilisée dans les aliments acides). Les bactériocines issues de *Lb. bulgaricus* sont considérées comme sécuritaires en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe).

11-Comportement associatif des deux souches

St. thermophilus et *Lb. bulgaricus* se développent en association, appelée proto-coopération, dans des cultures mixtes ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel (**Driessen, 1981 ; Radke-Michell et Sandine, 1984 ; Radke-Michell et Sandine,1986**).

Ces bactéries, par leur activité acidifiante, ont un effet bénéfique du point de vue qualité hygiénique de produit. En parallèle, elles engendrent des produits secondaires qui contribuent à la qualité organoleptiques du yaourt. D'un point de vue nutritionnel l'activité fermentaire de ces espèces lactiques favorise une solubilisation des différents constituants du lait améliorant ainsi leur biodisponibilité (**Courtin et al, 2002 ; Ngounouet al.,2003**).

Lors de la production de yaourt l'utilisation combinée des deux espèces bactériennes permet de valoriser l'interaction indirecte positive existante entre elles. Cette interaction appelée proto-coopération se traduit d'abord par une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures, la coagulation du lait prend 6-10h à 45°C en culture pure et 2-2,5h en culture mixte (**Pette et Lolkema, 1951; Davis, 1971**). Un accroissement des concentrations bactériennes est observé en parallèle (**Amoroso et Nanca, 1990**) avec une résistance plus élevée à l'acidité du milieu (**Flejtas et Gruev, 1977 ; Accolas et al., 1982 ; Radke-Michell et Sandine, 1986; Juillard et al., 1988**). Elle induit également une amélioration de la production des composés d'arômes (acétaldéhyde notamment) (**Flejtas et Gruev, 1977 ; Matalon, 1986 ; Abou-Donia, 1986 Chomakov, 1987; Obretenova, 1987**) et de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes de synérèse) (**Kondratenko et al., 1985 ; Matalon et Sandine, 1986 ; Ernest 1990**).

12-Facteurs influençant la proto-coopération des deux souches

Le métabolisme mutuel de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* dans le lait est commenté dans plusieurs documents (**Driessen, 1981 ; Driessen et Kingma, 1982**). nous citerons quelques unes des interactions fondamentales entre les deux espèces dans la culture de départ. La stimulation de *St. thermophilus* par *Lb. bulgaricus* est réalisée grâce à l'activité protéolytique du lactobacille, qui libère des petits peptides et des acides aminés au profit du streptocoque (**Driessen et Kingma, 1982 ; Tammamet et al., 2000**). Les plus importants de ces acides aminés nécessaires à la croissance mutuelle des deux souches sont : l'histidine, la thréonine, la valine (**Tamime et Robinson, 2003**).

En retour, *St. thermophilus* fournit de l'acide formique et du CO₂ qui tous deux vont stimuler la croissance de *Lb. bulgaricus* (**Tamime et Robinson, 2003**). *St. thermophilus* assimile l'oxygène dans le lait plus rapidement, créant ainsi des conditions favorables pour la croissance de *Lb. bulgaricus* (**Yaygin, 1970; Tamime et Robinson, 2003**). Selon certains auteurs *St. thermophilus* produit de grandes quantités de dioxyde de carbone (CO₂) qui n'est pas issu du métabolisme du lactose (**Driessen et Kingma, 1982 ; Thunell et Sandine, 1985**), ce CO₂ produit est dû à l'activité de l'uréase qui hydrolyse l'urée du lait en CO₂ et NH₃ (**Eck et Gillis, 1997**). Certaines souches de *St. thermophilus* ne possèdent pas cette activité protéasique (**Simova, 2007 ; Angelov et al., 2009**), par conséquent certains auteurs expliquent cette production de CO₂ par la voie de Leloir selon

laquelle le galactose produit est transformé en acide lactique et en CO₂, assurant ainsi les conditions d'anaérobiose pour la croissance des lactobacilles

Lorsque d'autres bactéries notamment probiotique sont associées aux bactéries du yaourt, d'autres interactions prennent place. Par exemple, les bifidobactéries sont stimulées par l'activité protéolytique des lactobacilles alors que *Lb. bulgaricus* limite le développement de *Lb. Acidophilus* (phénomènes de compétition et d'inhibition). En outre, des phénomènes de croissance associative ont été démontrés entre *St. thermophilus* et *Lb. Helveticus* ou *Lb. acidophilus*. Enfin, des mécanismes d'inhibition spécifique entre les souches liés à la production de bactériocines existent chez les bactéries probiotique comme chez les bactéries du yaourt. Ces caractères sont toutefois dépendants des souches présentes dans le milieu. Il est donc nécessaire de vérifier la compatibilité des souches avant de les associer (**Beal et Sodini, 2003**)

Partie 02 :
Etude expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I .Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, à la faculté des sciences de la nature, de la vie et des sciences de la terre et de l'univers (FSNV- STU), relevant de l'université de Bordj Bou Arreridj- Algérie.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la qualité physico chimique, microbiologique et d'estimer, puis, de caractériser la viabilité des levains lactiques thermophiles par des dénombrements sur des milieux bactériologiques sélectifs, cela pour un effectif de douze échantillons de yaourt et enfin la Mise en évidence de l'activité antagoniste dirigée contre des souches G^+ et G^- et eucaryotes

I -1-Matériels

la réalisation de l'étude a nécessité l'usage de matériel lourd (machines , appareils), léger :verreries ,réactifs, milieu de culture ,aditifs (**annexe I**) .

I .1.1-Echantillonnage

Douze échantillons de yaourt ont été prélevés du marché local dans la localité de Bordj Bou Arreridj Nord Est de l'Algérie : dix échantillons du yaourt industriel, fabriqués à base de lait en poudre recombinaés, emballés Neuf dans des pots de 100 g et 1 dans un pot de 250 ml, les deux échantillons collectés dans la même localité ; du lait fermenté subit une fermentation de 24h à température ambiante , sous l'action de la flore spontanée , sans aucun traitement thermique préalable .

I.1-1.2-Origin des échantillons

Tableau n03 :Représentatif de l' Origine des échantillons

Ech	Label	Nature/produit	Poids/ Volume	Date/prélevé ment	Operateur
E.01	Somam1	Yart.au lait reconstitue aromatisé	100g	26-4-2017	Laiterie de somam
E.02	Somam2	Yart.au lait reconstitue aromatisé	100g	26-4-2017	Laiterie de somam
E.03	Activia	Yart.au lait reconstitue aromatisé	100g	26-4-2017	Laiterie de somam
E.04	Bingo	Yart.fruité	250ml	26-4-2017	Laiterie de Major
E.05	Danone	Yart.au lait reconstitue aromatisé	100g	26-4-2017	Danone jurdjraalgerie
E.06	Batouche	Y. Aromatisé partiellement écrémé	100g	26-4-2017	Laiterie de Batouche
E.07	Trèfle	Y.au lait entier reconstitue	100g	26-4-2017	Laiterie de trèfle
E.08	Ramdy	Y. Sucré aromatisé partiellement écrémé	100g	26-4-2017	Laiterie de Ramdy
E.09	Hodna	Y. Aromatisé partiellement écrémé	100g	26-4-2017	Laiterie de Hodna
E.10	P.Nova	Y.sucré aromatisé partiellement écrémé	100g	26-4-2017	Société suis_ lait
E.11	LFA.1	Fermentation spontané a T C ambiante	250ml	26-4-2017	Fermentation spontané
E.12	LFA.2	Fermentation spontané a T C ambiante	250ml	26-4-2017	Fermentation spontané

E Echantillon, L.F.A Lait Fermenté Acidifié, P. Nova Palma Nova

Tableau n04 :Représentatif des flores pathogènes utilisés et recherchés

Flores/Dénombrement en UFC*/g	Milieu de culture utilisé/ Marque	Incubation/ Lecture/
Flores eucaryotes (Levure moisissures aérobies)	Gélose Saboraud/ IPA* Algerie	05 jours/ à température ambiante
Flore totale aérobie mésophile (F.T.A.M)	PCA/ Plant Count Agar à 30°C/ Pronadisa Spain	Après 48H à 30°C
Coliformes totaux	BLBVB*/37°C+ Cloche/ Pronadisa Spain	24H/ 37°C
Coliformes fécaux et flores indologenes à 44.5°C	BLBVB*/ 44.5°C+Cloche Test de McKezy Pronadisa Spain	24H/ 44.5°C
Streptocoques du groupe D	Milieu Rothe/ 37°C- Test (Présomptif). Lits (Test Confirmatif) Pronadisa Spain	24H/ 37°C
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteur (CSR*) (Spores + formes végétatives)	Gélose. Viande foie/ Sulfite de Na+ Alun de fer à 37°C/ IPA Algerie	24h/ 48H jusqu'à 72H à 30°C
<i>Pseudomonas Sp</i>	Gélose Citrimideé/ Idealab Alegrie	24H/ 28°C
<i>Salmonella Sp</i>	Bouillon Muller kauffman+ Gelose hektoue Idealab Alegrie	24H/37°C
Recherche des <i>Staphylococcus Sp</i>	Bouillon Giolitti Cantoni Enrichissement et isolement sur Gélose Baird Parker/ Ideall Algerie	24H/37°C

I -2-Méthodes

I -2.1-Analyses physico-chimiques du yaourt :

La mesure des pH à l'aide d'un pH mètre, type Sertes/ Inolab pH730 (Germany), l'acidité en degré dornic par neutralisation, à l'aide de la soude N/9, d'un volume lait fermenté auquel est ajouté un indicateur de pH (solution alcoolique de 01% de phénolphtaléine, (1°D= 0,1g /L d'acide lactique) (Chamba et Prost, 1989).la mesure de conductivité était fait par un conductimètre ($\mu\text{s}/\text{cm}$) La prise des valeurs de la viscosité, des échantillons, réalisée par écoulement à température ambiante puis par viscosimètre de marque: Rion Viscotester VT-03F (Origine: Chinoise) avec une limite de mesure à 20°C :

est de 300 mPascal (S), la densité est mesurée à l'aide d'un densimètre et exprimé en (g/ml/cm³).

La méthode de Kjeldahl est appliquée pour déterminer la quantité de protéine. C'est la méthode de référence pour la détermination en azote contenu dans un produit. Elle s'effectue en trois étapes : la minéralisation (digestion), la distillation et le titrage.

La minéralisation vise à convertir la totalité de l'azote organique en ions ammonium (NH₄⁺). Les molécules organiques mises en présence d'un bon rapport acide sulfurique concentré (H₂SO₄) / sulfate de potassium (K₂SO₄) catalysé par du sulfate de cuivre, sont décomposées par oxydation pour donner principalement du CO₂ et de l'eau. L'azote organique quant à lui est converti en sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄.

On ajoute un excès d'hydroxyde de sodium (NaOH) au digestat refroidi pour permettre la transformation de l'azote, sous forme de sulfate d'ammonium, en ammoniac (NH₃). Ce dernier est distillé dans un excédent d'acide borique et déterminé par titrage avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl). La procédure de dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl est détaillée en (**annexeII**).

Conversion du taux d'azote en taux de protéines

Le taux de protéines est déterminé en multipliant le taux d'azote obtenu par le facteur 6,38. Notons que celui-ci est variable en fonction de type de l'échantillon considéré. Il est par exemple de 5.6 pour les grains de blé, 6.25 pour l'œuf et les viandes.

I -2.2-Traitements statistiques des résultats d'analyses physico-chimiques :

Le calcul de la moyenne et l'écart type s'est fait à l'aide de programme statistique dans la calculatrice.

Scientifique : EXP E 01

Mode - 2 – Shift – ON - = (4,5M+,127,5M+,6 ,65M+,11,5M+,5,65M+,4,25M+,19,5M+) – Shift – 1 pour la moyenne.

Mode-2 – Shift – ON - = (4,5M+,127,5M+,6 ,65M+,11,5M+,5,65M+,4,25M+,19,5M+) – Shift – 3 pour l'écart type.

I -2.3-Analyses microbiologiques :

Les estimations des charges, en bactéries lactiques (L.A.B*; LacticAcidBacteria), pour chaque échantillons, ont été basées sur des dénombrements (à partir des dilutions,

réalisées par une solution d'eau physiologique) des Lactobacilles mésophiles à 37°C, et thermophiles à 44°C, sur le milieu gélosé MRS (Pronadisa Spain) - (De Man et al, 1960), et des Lactocoques mésophiles à 37°C et thermophiles à 44°C, sur le milieu gélosé M17 (Pronadisa- Spain) (Tarzagli et Sandine, 1975). L'ensemencement des différents échantillons, s'est fait en surface de la gélose M17 (Norme ISO 7889/IDF, 2003) pour les streptocoques lactiques, en profondeur (en double couche) pour la gélose MRS, pour les Lactobacilles (Norme ISO 20128/IDF, 2006). Les dénombrements des colonies de bactéries lactiques, ont été réalisés après 24h, 48h et 72h d'incubation, à l'aide d'un compteur de colonies (Selecta J.P.- Spain), les résultats, (sont les moyennes des trois répétitions (triplicatas), ont été exprimés en UFC*/ml (unité formant colonies/millilitre du produit).

I -3-Exploration In Vitro d'antagonisme entre isolats lactiques et souches pathogènes :

La détermination de l'action antimicrobienne des souches lactiques thermophiles, dirigée contre des souches pathogènes, réalisée selon un protocole inspiré de celui de :

Tagg et Mc Given (1971); Tagg et al (1973); Thompson et al (1996).

a-Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram positif

b- Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram négatif

c- Entre souches lactiques et souches pathogènes eucaryotes

I -3.1- Revivification des souches indicatrices (pathogènes)

Les souches pathogènes, procaryotes, à paroi Gram négatif et à paroi Gram positif, ont été utilisées comme étant des souches cibles (indicatrices), impliquées dans des pathologies humaines, ont été conservées sur des milieux de culture appropriés (bouillon nutritif, pour les souches à Gram négatif, bouillon Cœur-cervelle pour les Gram positif, (voir composition de ces milieux en **annexe III**), à la température de réfrigération. Elles ont été réactivées, par double incubation sur bouillon correspondant, à des températures d'incubation optimales pour leur croissance pendant 24H, ceci est pour la recherche des substances inhibitrices produites par les souches lactiques isolées.

Tableau n05 : Présentation (origine, Gram et conditions de réactivation) des souches pathogènes utilisées.

Souches cibles		Gram	Bouillons et T°C. de réactivation	Origines
Flore eucaryote				
Levures	<i>Candida albicans</i>	Eucaryote	EPL à 30°C	Voies urinaires
Flore procaryote				
Gram ⁻	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G ⁻	37°C	Pathogène des aliments
	<i>E.coli</i>	G ⁻	BN à 37°C	Pathogène.
	<i>Proteus mirabilis</i>	G ⁻	B N à 37°C	Voies urinaires.
	<i>Salmonella typhimurium</i>	G ⁻	B N à 37°C	Pathogène des aliments.
Gram ⁺	<i>Enterococcus faecalis</i>	G ⁺	E.P.L à 37°C	Pathogène pour l'homme.
	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺	E.P.L à 37°C	Pathogène pour l'homme
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	G ⁺	E.P.L à 30°C	Médical- pathogène.
	<i>Bacillus cereus</i>	G ⁺	B N à 37°C	Pathogène pour l'homme.

I -3.2- Revivification des souches lactiques thermophiles

Les souches lactiques, isolées à partir des échantillons du yaourt qui ont été conservées à une température de +4°C, et réactivées avant leur utilisation, par des transferts successifs, sur des milieux de culture appropriés; le milieu M17 liquide pour les lactocoques et le milieu MRS liquide pour les lactobacilles, incubées à 42°C, pendant 24 H, jusqu'à l'obtention d'un coagulum.

I -3.3-Mise en évidence de l'activité antagoniste

La détermination de l'action antagoniste (effet inhibiteur) des souches lactiques isolées dirigées contre les souches pathogènes (voir **annexe III**), est réalisée en utilisant le milieu de culture Mueller-Hinton.

L'activité antimicrobienne (bactériocinogène) se révèle par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques, dont le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égal à 02mm (**Tag et sal., 1973; Thompson et al., 1996**).

Les boîtes sont examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des disques.

Chapitre II :

Résultats et discussion

II -Résultats

II –2-1-Résultats des analyses physico-chimiques

Tableau n 06 : résultats des analyses physico chimiques

Ech	Label	pH	Acidité (°D)	Cd (µs/cm)	Vs (mPa/s)	Densité g/ml/cm ³	N.tot al(g/l)	Prt(g/l)	M	E. Type(m)
E.01	Somam 1	4,5	127,5	6,65	11,5	5,65*	4,25	19,5*	179,55	53,49
E.02	Somam 2	4,6	252**	7	10,2	1,63	4,85	20,5	300,78	92,37
E.03	Activia	5,3**	141,5	5,7	10,5*	1,60	4,75	22,75	192,1	50,77
E.04	Bingo	5	160,5	5,2*	11	1,31	3,65	27,32	213,98	57,96
E.05	Danone	4,30*	155,5	6,5	10	5,35	4,35	20,55	206,55	55,85
E.06	Batouche	4,35	163	6,80	9,75	5	4,42	25,2	218,58	58,58
E.07	Trèfle	4,65	85*	6,65	10,5	5,25	4,72	24,5	241,27	29,44
E.08	Ramdy	4,45	121	6,75	13,5* *	4,96	3,48	25	179,14	42,75
E.09	Hodna	4,40	105	6,95	11,5	5	3,78	27	163,63	36,90
E.10	P.Nova	4,35	133	6	12	5,70	3,22*	22,5	186,77	47,35
E.11	LFA. 1	4,80	95,5	6,50	11	5,50	5,12	29,3	157,72	33,34
E.12	LFA. 2	4,9	131,5	7,35**	11,5	1,25*	5,24**	31,67**	193,41	46,89

Ec : Echntillon, **Vs** : Viscosité en millipascal/seconde (mPa/S), **Cd** : Conductivité en microsiemens/centimetre (µs/cm), **N.total** : Azote total (g/l), **Prt** : Proteines (g/l)

Les valeurs du pH testé sur 12 échantillons du yaourt commercialisé à sa production, oscillent entre 4.30 (min) pour Danone, et 5.30 (max) pour l'échantillon 3 (Activia).

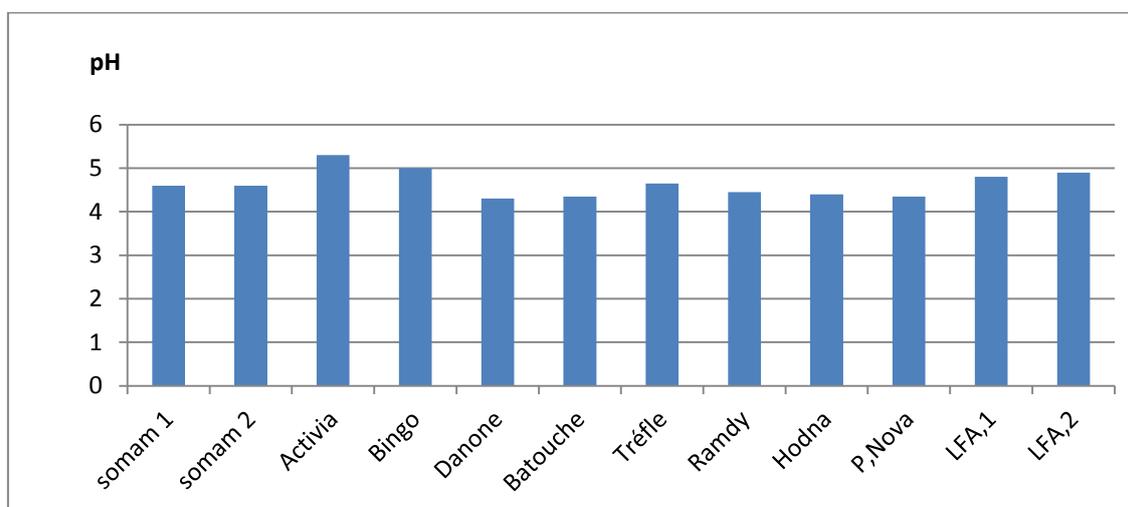


Figure 02 : histogramme représentatif des pH des échantillons.

Le dosage du lactate en degré Doronic, a montré que l'échantillon E7 (Trefle) est le moins acide (85°D), alors que l'échantillon E2 (Somam 2) est le plus acide (252°D), par rapport aux l'ensemble des échantillons.

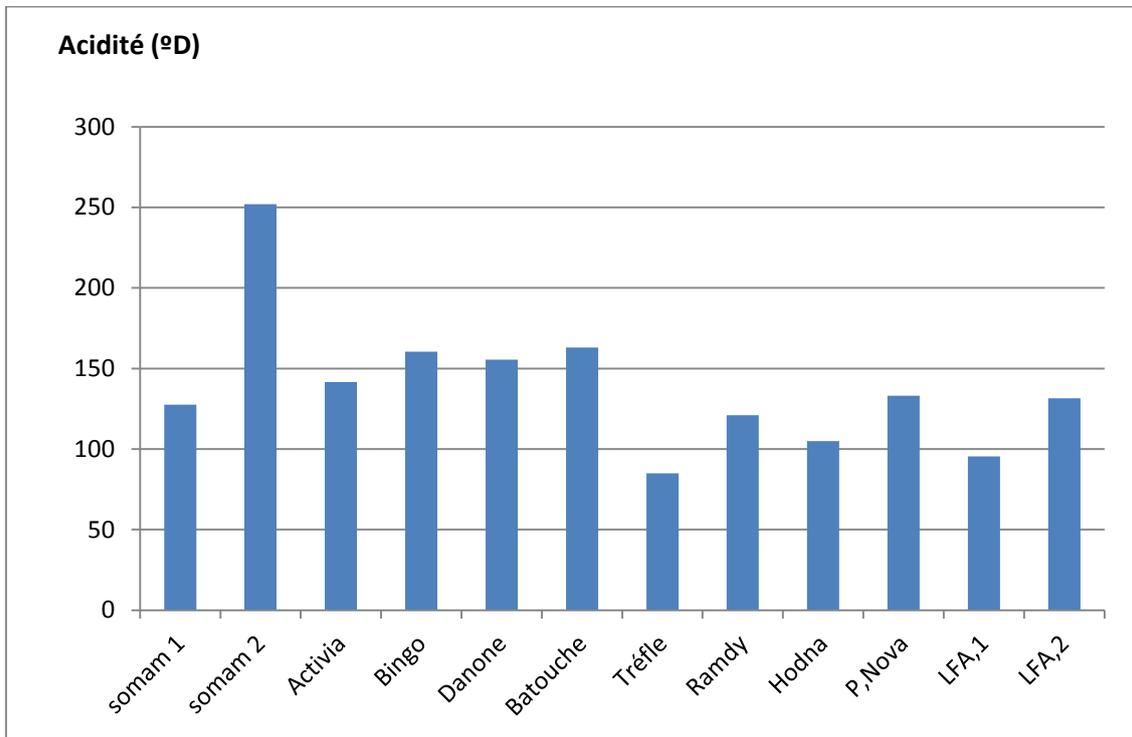


Figure 03 : histogramme représentatif des acidités (°D) des échantillons.

La conductivité mesurée en (ms/cm), a donné une valeur minimale de 5,2 (Bingo), allant jusqu'au 7,35 (LF2).

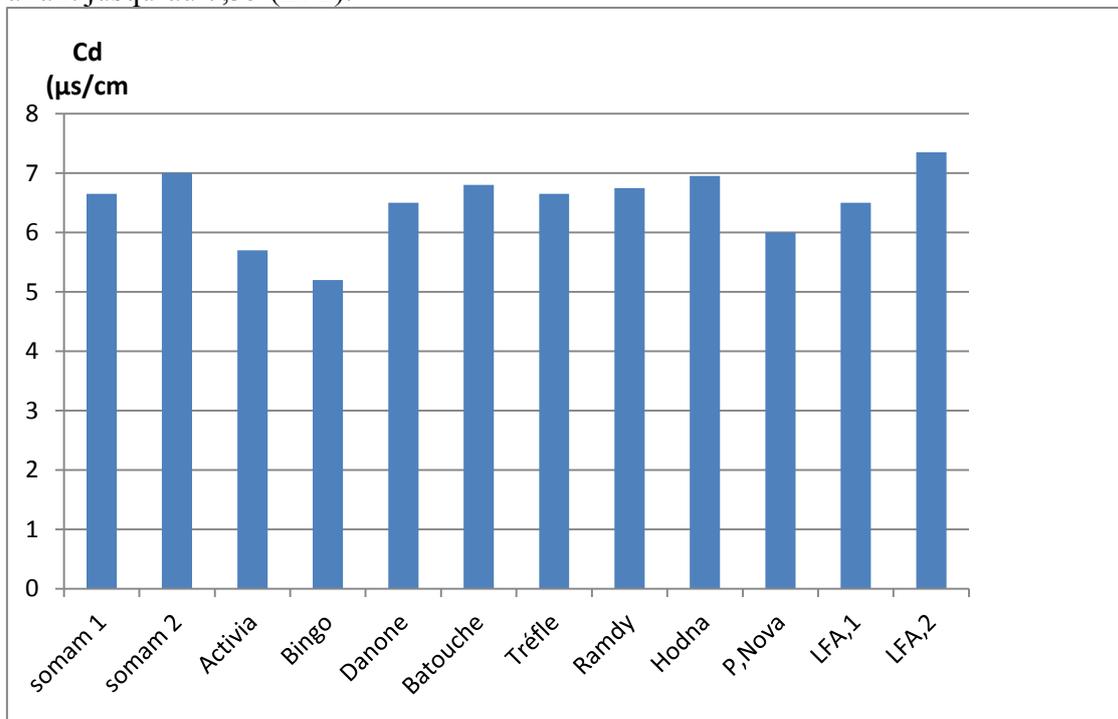


Figure 04 : histogramme représentatif des conductivités des échantillons.

La viscosité mesurée (mPa/s) a donné une valeur minimale de 10,5 (Activia), allant jusqu'au 13,5 (Ramdy).

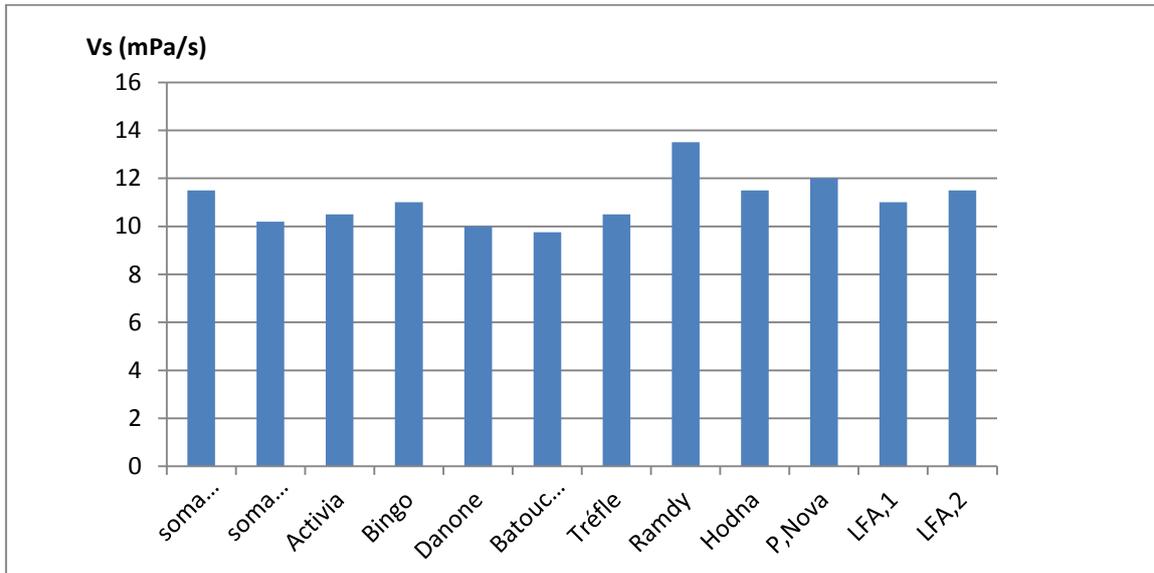


Figure 05 : histogramme représentatif des viscosités des échantillons.

Les valeurs de la densité testé sur 12 échantillons du yaourt commercialisé à sa production, oscillent entre 1,25 (minimale) pour l'échantillon E1 (Somme 1), et 5,65 (max) pour L'échantillon LFA 2.

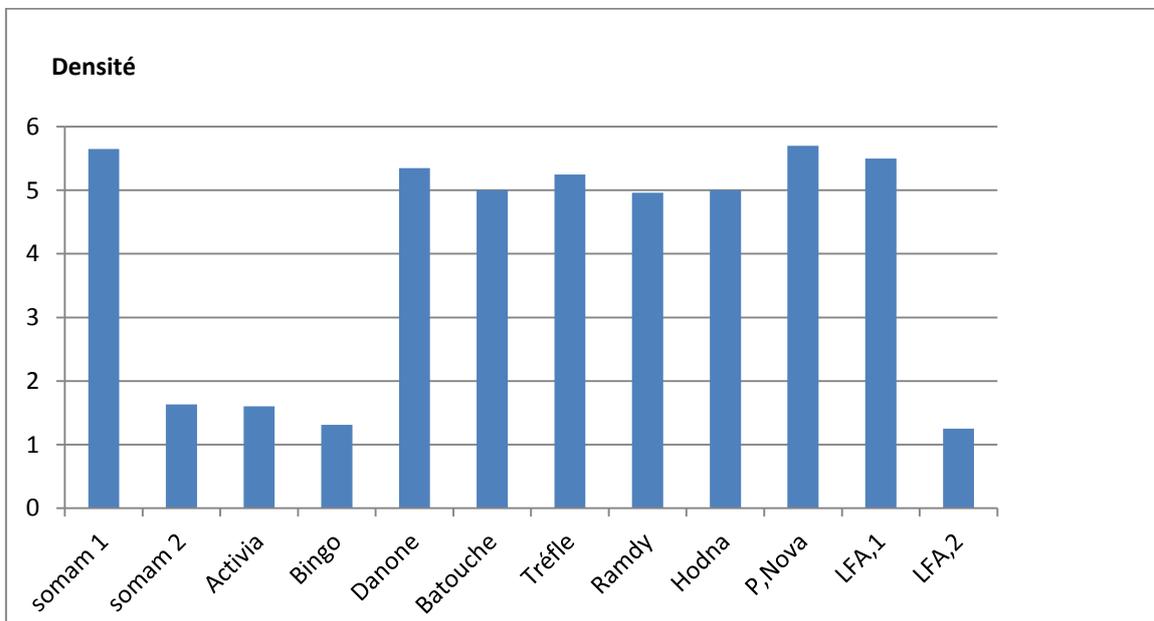


Figure 06 : histogramme représentatif des densités des échantillons.

La quantité d'azote totale marquée était cernée entre 3,22g/l pour l'échantillon E10 (P.NOVA) et 5,24 pour LFA.2.

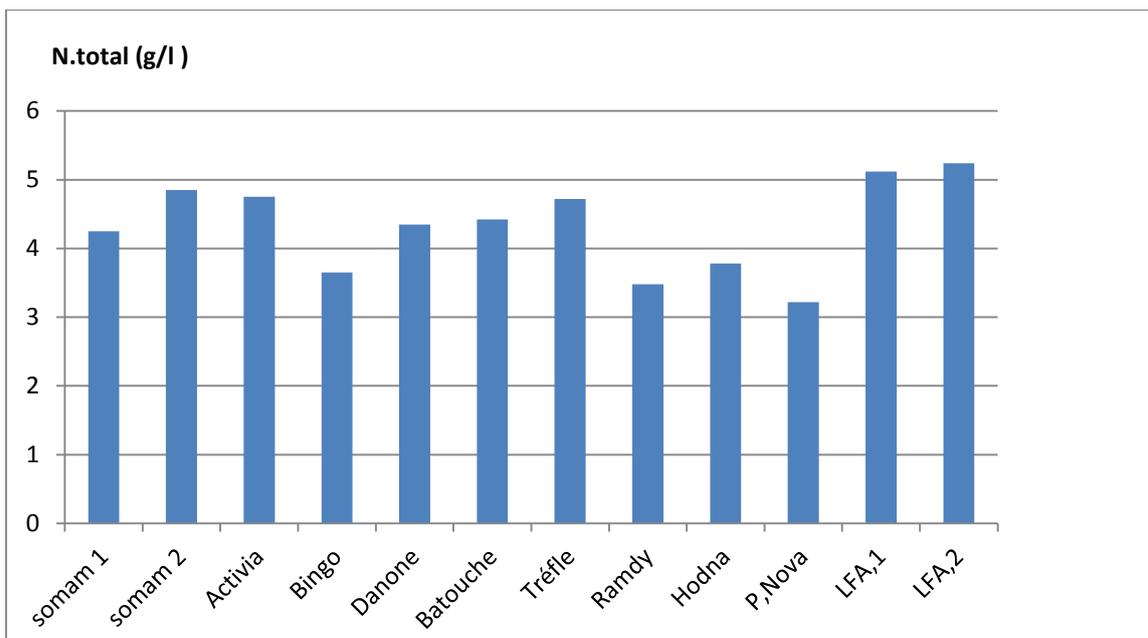


Figure 07: histogramme représentatif des N totales des échantillons.

Le dosage des protéines, a montré que la quantité la plus élevée, était enregistrée pour l'échantillon LFA. 2. Tandis que la valeur minimale a été marquée chez E1 (Somam 1).

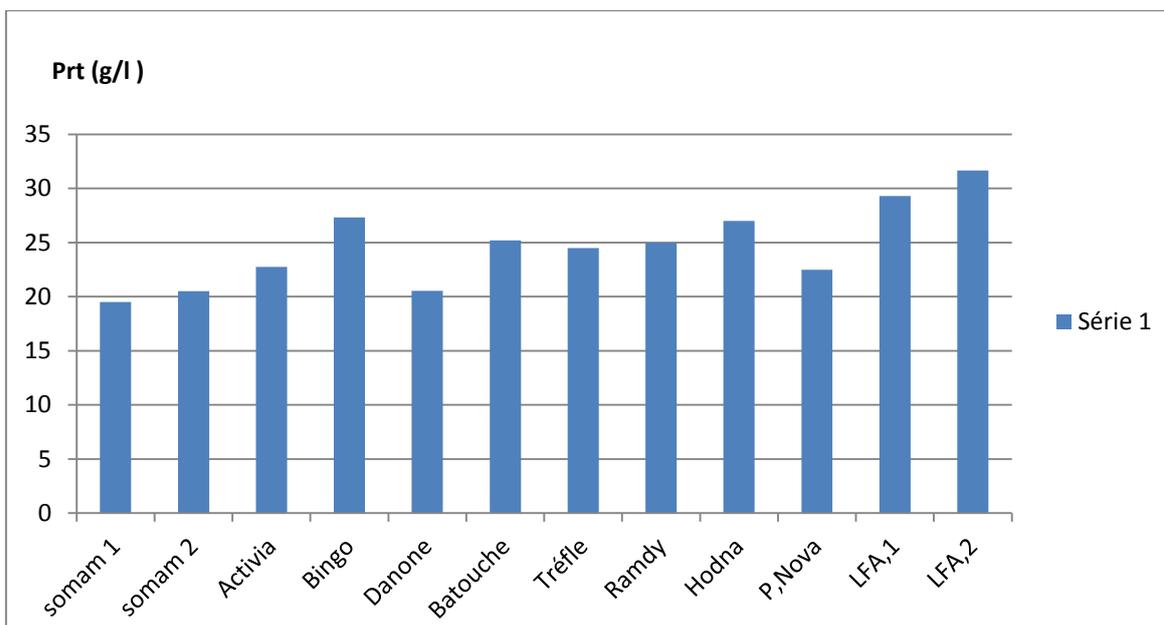


Figure 08: histogramme représentatif des protéines des échantillons.

Il est à signaler que l'ensemble des pots des échantillons, y compris les laits fermentés acidifiés LFA 1 et LFA 2, inspecté à l'œil, étaient exempt de tous défauts de fabrication : défaut d'emballage, gonflement, ouverture des pots, odeur suspecte ou formation des grumeaux ; signe de synérèse.

II -1-1-PH :

La législation sur le pH final des laits fermentés et des yaourts, diffère d'un pays à l'autre (**Corrieu et Luquet, 2005**). Beaucoup de pays expriment l'acidité du yaourt directement par le pH final (pH < 4,6 pour l'Espagne, pH < 4,5 pour les Pays-Bas, l'Australie et le Mexique), d'autres pays définissent l'acidité du yaourt en termes de pourcentage exprimé en acide lactique (< 0,7% pour la Belgique, < 0,8% pour le Canada et < 0,9% pour les Etats-Unis) ou par gramme d'acide lactique par 100 grammes de yaourt (> 0,7 pour la France, le Portugal et l'Italie, 0,8 pour la Tunisie) (**Béar et Corrieu ;1998. Corrieu et Luquet, 2005**).

Dans les laits fermentés, particulièrement, les yaourts, la cinétique d'acidification des deux espèces lactiques, est d'évolution différente, voir même contradictoire (**Angelov et al., 2009**). Ce trait, est lié aux caractéristiques physiologiques, biochimiques des deux espèces lactiques utilisées :

L'espèce *Streptococcus thermophilus*, ayant une vitesse élevée d'acidification (**Meribai et al., 2010**), contrairement à l'espèce *Lactobacillus bulgaricus*, ayant une cinétique d'acidification relativement lente et un pH optimum de croissance, au tour de 04,90 (**Courieu et Luquet, 2008**). Alors que l'espèce St Th est dotée d'uréase ce qui lui confère un effet tampon contre l'acidité du milieu fermentaire d'où un survie en milieu acide. **Meribai et al., (2015 ; 2016)** Sachant que, la température relative du processus fermentaire du yaourt, est de 45°C, proche de l'optimale pour les deux espèces lactiques (**Béal et Corrieu, 1991**).

Selon, (**Tabasco et al., 2007**), une température de 45°C pour l'isolement et l'incubation des *Streptococcus thermophilus* à été recommandée, Cependant; certains auteurs (**Degeestet al., 2002; Tabasco et al., 2007**); ont conclu que l'espèce *Streptococcus thermophilus*, en culture mixte, exige une température optimale située entre: 42°C et 46°C. Le pH du yaourt, est proche de celui du suc gastrique, ce caractère, permet la survie de cette flore lactique thermophile, lors de son passage gastrique, d'où l'effet probiotique espéré.

II -1-2-L'acidité :

Il y a 2 organismes vivants que l'on retrouve habituellement dans le yaourt: *Lactobacillus delbrueckii sub sp. bulgaricus* et *Streptococcus salivarius sub sp. Thermophilus*. *Lactobacillus bulgaricus* apporte essentiellement de l'acidité. Il se développe bien à une température allant de 47 à 50 °C. *Streptococcus thermophilus* est

moins acidifiant que la précédente; il développe davantage l'arôme. Il se développe à une température allant de 42 à 45 °C, mais croît encore à 50 °C. D'autres cultures sont également parfois utilisées: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*. Les bactéries du yaourt sont capables de traverser sans dommage l'estomac pour s'installer dans l'intestin où elles aident à la digestion. Elles favorisent la guérison de la diarrhée, tant chez l'adulte que chez l'enfant. Renforcement des défenses immunitaires, diminution de l'inflammation du colon (maladie de Crohn).

les ferments du yaourt transforment le **lactose** (un sucre présent dans le lait) en **acide lactique** (donnant au yaourt sa consistance spécifique) au cours du processus de fermentation. L'acide lactique du yaourt amène le pH du lait de 6,8 à 4,5 pour le yaourt. Cette acidité évite le développement de bactéries pathogènes, cette fermentation ne peut se dérouler, qu'à une certaine température: trop froid (moins de 37 °C), les bactéries ne travaillent pas; trop chaud (plus de 55 °C), elles sont détruites. Selon que l'on privilégie l'acidité ou l'arôme, il faut:

- privilégier l'une ou l'autre souche: *Streptococcus* ou *Lactobacillus*
- la température d'incubation: de 40 à 42 °C: on favorise l'arôme (*Streptococcus*). Entre 45 et 46 °C, on favorise l'acidité (*Lactobacillus*)
- privilégier un levain jeune: yaourt doux et aromatique ou privilégier un levain plus âgé pour obtenir un yaourt acide (Ashraf. et Smith, 2015)

II -1-3-La viscosité :

Le yaourt est défini comme, un fluide viscoélastique, il possède, à la fois les propriétés visqueuses d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. La viscosité du produit cryoconservé, dépend de la vitesse d'écoulement ou de la force entre les molécules dans le fluide et l'interface du tube capillaire. La viscosité intrinsèque du yaourt est liée aussi à sa densité (plus la densité est faible plus le yaourt est pauvre en éléments et visqueux). Les changements de la viscosité, semblent en fonction de la marque d'échantillon analysé, sa composition, son mode de préparation: En général les douze échantillons du yaourt étudiés, possèdent une viscosité cernée entre 13.5 (max) échantillon 08 Ramdy et 9.75 (min) pour l'échantillon 06 Battouche. (Zisu et Shah, 2003) ont étudiés, l'effet de la température, du pH et de la supplémentation en protéines, sur la production des exopolysaccharides, responsables de la viscosité, par l'espèce *Streptococcus*

*thermophilus*1275, les différentes combinaisons entre ces paramètres, ont montré; que les plus grandes quantités des EPS ont été produites à pH: 04,08 et à 37°C, et à 40°C, contrairement à l'effet du pH, la température élevée de 45°C, avait diminué la production des EPS.

II -1-4-L'azote totale :

Premièrement relevons le fait que la détermination de l'azote d'un milieu protidique permet de connaître la proportion de protéines de ce milieu. La méthode utilisée est celle décrite par Kjeldahl en 1883 (voir annexe 2). Conventionnellement, on admet que toutes les protéines renferment 16% d'azote et on utilise le coefficient 6.25 pour passer de l'azote total aux protéines. Cette méthode a deux limites :

- D'une part la teneur en azote des protéines varie de 14 à 18% ;
- D'autre part, l'azote peut avoir une origine, par exemple origine ammoniacal, origine amide, etc.

Malgré cela, cette convention est pratique est très utilisée. Le dosage s'effectue en deux temps :

- La matière organique est attaquée par l'acide sulfurique concentré, et en présence de catalyseur l'azote passe à l'état d'ion ammonium (c'est la minéralisation);
- L'ammoniaque est déplacée par la soude, base plus forte. Par chauffage, elle distille avec l'eau. L'ammoniaque est recueillie dans la solution d'acide borique et dosée par une solution d'acide sulfurique diluée et de titre bien connu.

II -1.5- Les protéines

Les bactéries lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait. Ainsi, **Poznanski et al ;(1965)** ont rapporté une dégradation de la caséine par une protéase et une peptidase provenant respectivement de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. De ce fait, un yaourt contient plus de peptides et d'acides aminés libres que le lait **Rasic et al ;(1971)**. Il est généralement admis que la préhydrolyse des caséines améliore la digestibilité des protéines du yaourt. d'où, leur valeur biologique **Breslaw et Kleyn(1973)**. En outre, il a été montré chez le porc miniature **Gaudichon et al ;(1994)** et chez l'homme **Mahé et al ;(1994)** que la digestibilité des protéines de lait n'était pas différente, qu'il s'agisse d'un lait ou d'un yaourt. Le taux de préhydrolyse des caséines du yaourt est en fait minime. Il existe cependant une différence dans le processus de digestion des protéines de lait et de yaourt. Celle-ci réside au niveau gastrique, comme

l'ont montré de récents travaux réalisés chez des sujets sains, munis d'une sonde intestinale **Mahé et al ;(1994)**.La vitesse de libération des protéines dans l'intestin est plus lente et plus régulière, comparée à la vitesse de vidange des protéines de lait. C'est donc la cinétique de la vidange gastrique qui est modifiée, ce qui se répercute logiquement sur la cinétique d'apport d'acides aminés dans le sang portal. Cette cinétique est plus progressive dans le cas d'un yaourt sans que la digestibilité globale soit affectée(les protéines alimentaires apportent de l'azote et des acides aminés indispensables).

II -2-Résultats des analyses microbiologiques

Tableau n 07: Résultats des analyses microbiologiques

Flores/	Résultats UFC*/g	Normes de références - JO : 35/1998
Levures et moisissures	03, 2	≤ 100
F.T.A.M	07, 2	≤ 10
Coliformes totaux	Absence	≤ 10
Coliformes fécaux	Absence	≤1
Streptocoques du groupe D	Absence	
<i>Clostridium</i> sulfito-reducteur	Absence	
<i>Pseudomonas Sp</i>	Absence	
<i>Salmonella Sp</i>	Absence	Absence
<i>Staphylococcus Sp</i>	Absence	≤10

Les analyses microbiologiques ont montré l'absence totale des bactéries pathogènes Se qui signifie les bonnes qualités alimentaires et organoleptiques de notre échantillons.

II -3-Résultats des dénombrements des levains lactiques thermophiles

Tableau n 08 : illustrant les résultats des dénombrements des flores caractéristiques du yaourt

Ech	label	M17	MRS
E.01	Somam 1		
E.02	Somam 2	10^6	$05,5 \times 10^4$
E.03	Activia	$06,6 \times 10^{5*}$	07×10^4
E.04	Bingo	$07,8 \times 10^5$	$04,5 \times 10^4$
E.05	Danone	$03,45 \times 10^6$	05×10^4
E.06	Batouche	$03,75 \times 10^6$	$02,75 \times 10^4$
E.07	Trèfle	$05,85 \times 10^6$	$01,27 \times 10^{4*}$
E.08	Ramdy	$04,5 \times 10^6$	$03,32 \times 10^4$
E.09	Hodna	$02,42 \times 10^6$	$01,75 \times 10^4$
E.10	P. Nova	$02,85 \times 10^6$	$9,2 \times 10^{4**}$
E.11	LFA. 1	$07,26 \times 10^6$	$2,57 \times 10^4$
E.12	LFA. 2	$08,5 \times 10^{6**}$	$05,4 \times 10^4$

Les résultats des dénombrements sur milieu M17 montrent que E12 (LFA. 2) porte le plus grand nombre des flores caractéristiques du yaourt (*Streptococcus thermophilus*) tandis qu'E03 (Activia) porte le plus faible nombre et elles sont absents dans E01 (Somam 1).

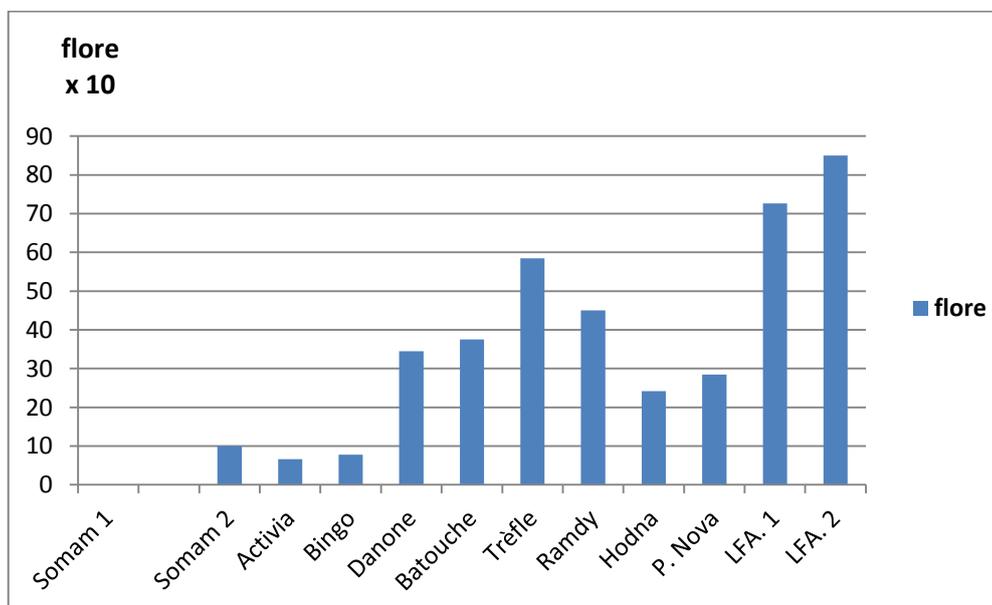


Figure 09: histogramme représentatif des flores dénombrées sur M17

Les résultats des dénombrements sur milieu MRS montrent que E10 (P. Nova) porte le plus grand nombre des flores caractéristiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus*),

tandis que E07(Trèfle) porte le plus faible nombre et elles étaient .totalement absentes dans E01 (Somam 1).

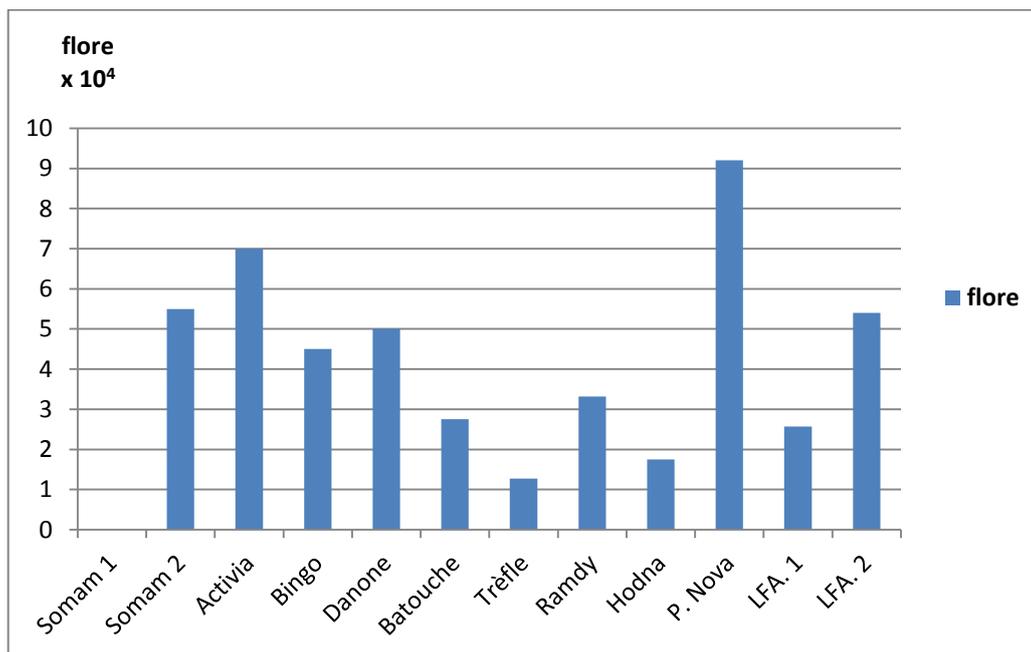


Figure10: histogramme représentatif des flores dénombrées sur MRS.

De façon générale, et pour l'ensemble des échantillons nous,avons noté une prédominance des espèces *Streptococcus thermophilus* sur M17 on comparision avec les *Lactobacillus bulgaricus* sur MRS

Streptococcus thermophilus est l'une des espèces lactiques, thermophiles, homofermentaires, les plus utilisées en industrie laitière **El Sharoud et al ;(2013)**, la seconde, après l'espèce lactique mésophile *Lactococcus lactis* **Hols et al ;(2005)**.

La seule espèce lactique dotée d'activité uréasique **Moraet al ;(2004) ; Zotta et al ;(2008) ; El- Sharoud et al ;(2013)**.

L'espèce assure, en culture mixte, a lui seule, une cinétique d'acidification rapide, par conversion du lactose en lactate **Meribai et al ;(2010)**. Sécrétion des exopolysaccharides **Wu et al ;(2014) ; Mostefaoui et al ;(2015)** Synthèse des vitamines, dont l'acide folique (**Iyer et al,2010**). La production des composés aromatiques, dont l'acétaldéhyde **Chavez et al ;(2003) ; Benaama et al ;(2011)**.

Traditionnellement l'espèce est utilisée en culture mixte ; en co-culture avec des lactobacilles thermophiles et certaines espèces *Bifidobacterium* sp **Oliveira et al ;(2009) ; Al meida et al ;(2009)**. Dans les yaourts, en co- culture avec l'espèce *Lactobacillus bulgaricus* **Courtin et Rul ;(2004) ; Angelov et al ;(2009)**. Dans certains fromages en co-culture avec *Lactobacillus helveticus* à l'exemple des fromages à pâte cuite : l'emmental,

gruyère et grana. **Bernardeau et al ;(2008)**. Aussi dans des fromages Italiens type : Mozzarella et les fromages Swiss type :Emmental **Iyer et al ;(2010) ; Gezginc et al ;(2013)**.

L'espèce ayant la présomption d'innocuité (GRAS), statut proposé par l'autorité européenne de la sécurité des aliments (**Delorme 2008**).L'acétaldéhyde est reconnu comme l'arôme majeur des laits fermentés acidifiés **Ott et al ;(2000) ; Valero et al ;(2001)**, des yaourts **Chavez et al ;(2002)** et de certains fromages **Ott et al ;(1997)**.

La production du yaourt, résulte de l'association des deux espèces thermophiles, *Streptococcus thermophilus* espèce ayant le statut G.R.A.S (Generally Recognised As Safe) **Delorme (2008)**;*Lactobacillus bulgaricus* espèce thermophile, anaérobie, reconnue aussi parmi les espèces lactiques ayant le statut GRAS **Bernardeau et al ;(2008)**, ces dernières doivent êtreensemencées simultanément et se trouvent vivantes, à un taux supérieur à 10⁶ufc/g (unité formant colonie), jusqu'à la date limite de consommation (D.L.C).

II -4- Exploration In Vitro d'antagonisme entre isolats lactiques et souches pathogènes

a-Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram positif

L'antagonisme microbien entre le SBA, neutralisé, dirigé contre des souches indicatrices pathogènes a donné des ZI, illustrées dans le tableau09, et la figure12, allant de 6 mm (contre *Staphylococcus aureus*), suivi de 13.mm (contre *Bacillus cereus*) à19mm (contre *Enterococcus faecalis*)

Tablea09: Diamètres en (mm) des zones d'inhibition (Z.I) obtenues avec des souches cibles pathogènes à Gram positif.

Souche lactique (SBA)	Souche pathogène	ϕ (mm)
S3	<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	8
S5	<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	7
S8	<i>Staphylococcus aureus</i> (10)	6
S5	<i>Bacillus cereus</i> (2)	13
S9	<i>Buacillus cereus</i> (2)	10
S3	<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	6
S8	<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	19
S9	<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	7
S5	<i>Micrococcus lutus</i> (19)	10
S8	<i>Micrococcus lutus</i> (19)	6
S9	<i>Micrococcus lutus</i> (19)	8

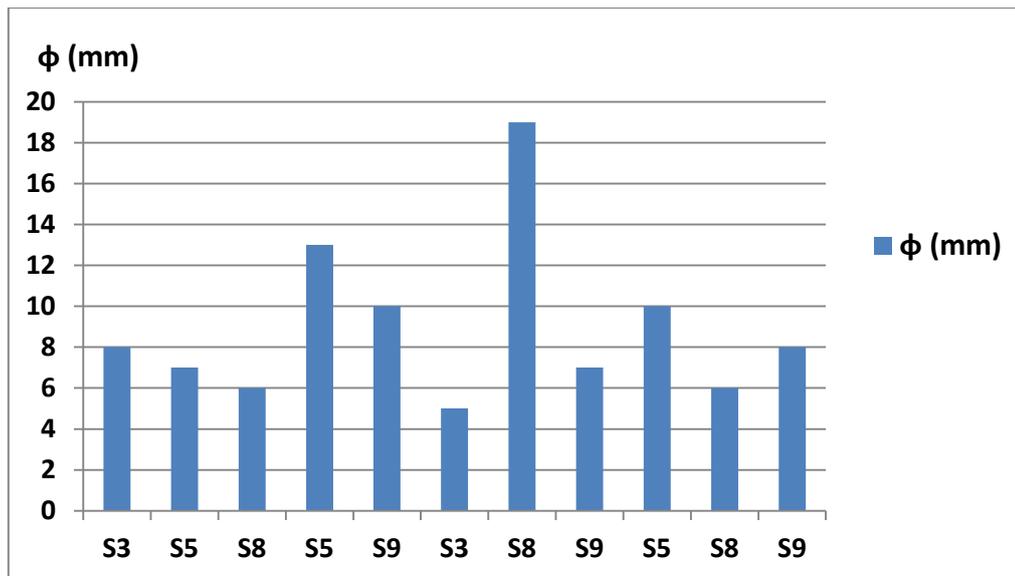


Figure11: Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches pathogènes à Gram⁺

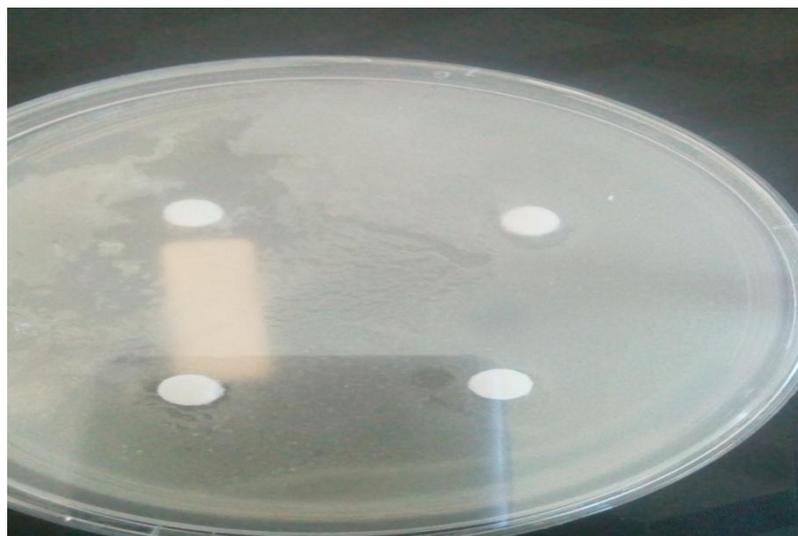


Figure 12: Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procaryotes pathogènes à paroi Gram +.

b-Entre souches lactiques et souches pathogènes à Gram négatif

Les interactions entre le SBA, neutralisé, et les souches pathogènes, ont exhibé des zones d'inhibition allant de 10mm (contre *E. Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), suivi de 7mm (contre *Proteus mirabilis*) à une ZI de 5 mm (entre SBA et *Proteus mirabilis*)

Le tableau 10 et la figure 14 récapitulent les diamètres des ZI dirigées contre les souches pathogènes à Gram⁻.

Tableau10:Antagonisme des(zones d'inhibition en mm) dirigé contre les souches pathogènes à Gram négatif.

Souche lactique (SBA)	Souches pathogènes	ϕ (mm)
S8	<i>Proteus mirabilis</i> (4)	7
S9	<i>Proteus mirabilis</i> (4)	5
S5	<i>E. coli</i> (9)	10
S8	<i>E. coli</i> (9)	7
S3	<i>Salmonella typhimurium</i> (7)	7
S5	<i>Salmonella typhimurium</i> (7)	6
S3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8)	10
S5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8)	7

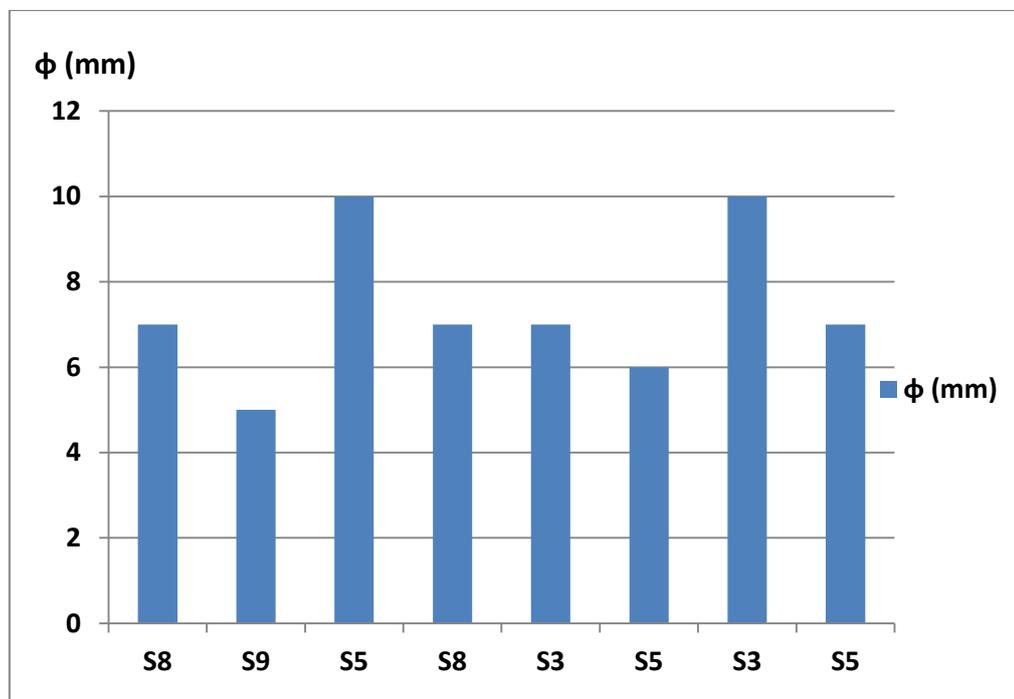


Figure 13: Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches pathogènes à Gram⁻

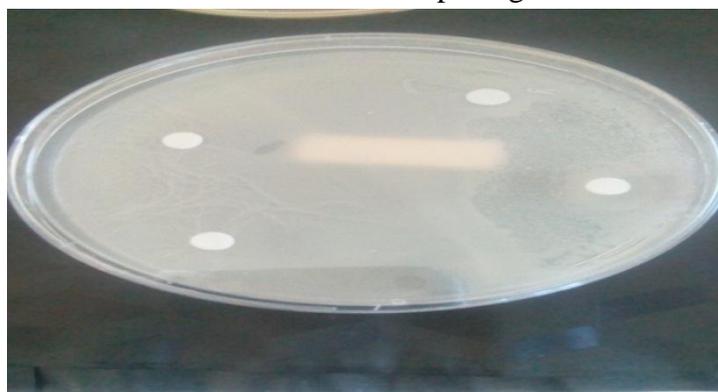


Figure14:Zones d'inhibition entre les souches lactiques et les procarvottes pathogènes à paroi Gram -.

c-Entre souches lactiques et souches pathogènes eucaryotes

Le diamètre maximal noté après interaction entre la souche S8 et *Candida albicans* est 9mm, tandis que celui de l'interaction entre la souche S9 et *Candida albicans* est 6 mm.

Le tableau 11 et la figure 16 représentent les zones d'inhibition vis-à-vis les eucaryotes

Tableau n11: Tableau représentatif des zones d'inhibition entre isolats lactiques et souches eucaryotes (levure).

Souche lactique (SBA)	Souche pathogène	ϕ (mm)
S8	<i>Candida albicans</i> (11)	9
S9	<i>Candida albicans</i> (11)	6

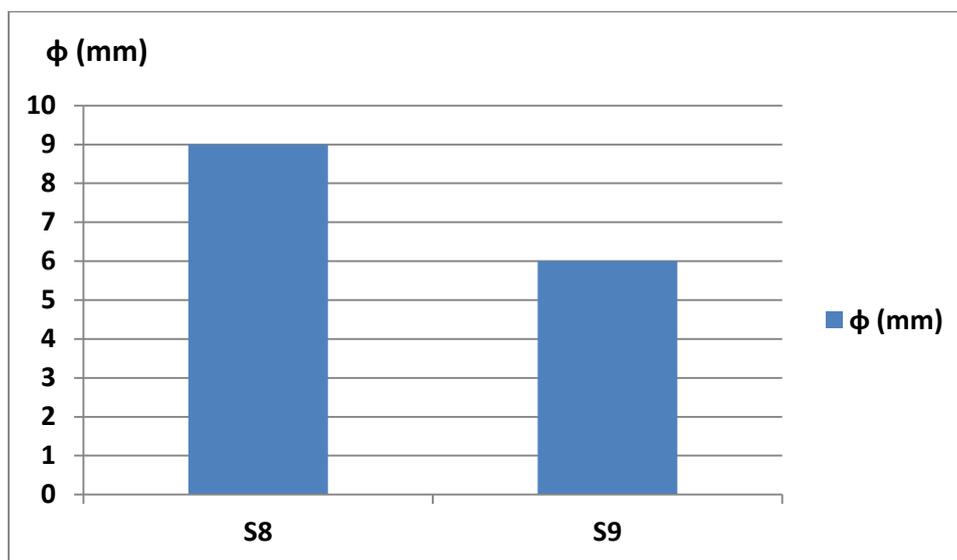


Figure15: Histogramme représentatif des Z.I (mm) après effet inhibiteur des LAB dirigé contre les souches eucaryotes(levure)

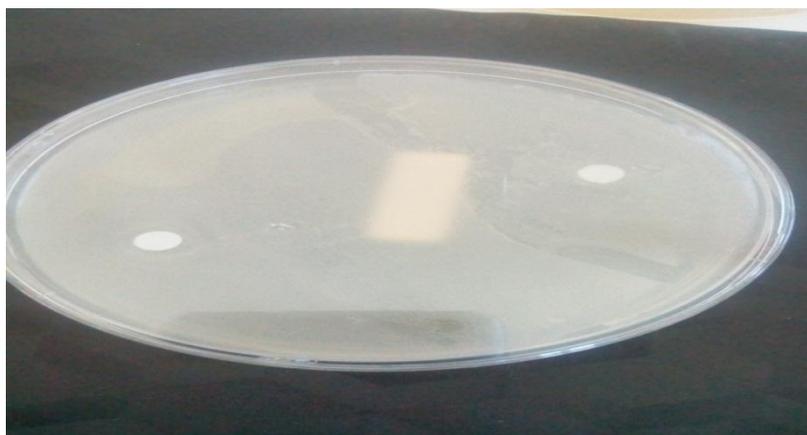


Figure16: Illustration du pouvoir inhibiteur sur M.H (ϕ en mm) dirigé contre des souches eucaryotes(levure)

II -5- Résultats d'activité antimicrobienne relative aux espèces *Streptococcus thermophiles*

L'effet inhibiteur, du SBA, semble souche streptocoque dépendant, et il diffère d'une souche cible à une autre. La souche la plus performante avec les meilleures zones d'inhibition, était S8 avec 19 mm de diamètre contre la souche indicatrice (pathogène) *Enterococcus faecalis*. La souche la moins performante, S9, avait un diamètre de 5 mm contre *Proteus mirabilis*.

L'espèce est connue, pour ses productions des bactériocines, ayant large spectre d'action, contre les Gram (+) et Gram (-) et même, contre les eucaryotes (levures et champignons).

Les résultats des interactions, indiquent l'existence des substances inhibitrices (métabolites) produites dans le surnageant: SBA, du lait écrémé reconstitué par les souches streptocoques lactiques. Cependant, l'ensemble des souches, ne présente pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes.

La meilleure zone d'inhibition (19mm de diamètre) a été observée pour la souche S8 contre *Enterococcus faecalis* tandis que le plus petit diamètre d'inhibition est de 5mm, a été observé pour la souche S9 contre *Proteus mirabilis*.

L'activité inhibitrice (antimicrobienne) des bactéries lactiques, est peut être attribuée à plusieurs substances (métabolites), ayant des propriétés antimicrobiennes (**Dortu et Thonart, 2009**). Cependant, l'apparition des zones d'inhibition dans le milieu, ne peut confirmer, à elle seule, que nos souches lactiques sont bactériocinogènes, ces zones inhibitrices, peuvent être attribuées, à l'acidification du milieu (**Desmazeaud, 1983**).

En outre, l'activité inhibitrice des bactéries lactiques, peut être attribuée, à plusieurs autres substances telles, le CO₂, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le diacétyl **Navarro et al., 2000; Rodriguez et al ;(2002); Aslam et Qazi, (2010)**.

Plusieurs facteurs, peuvent avoir, un effet sur la production de bactériocines tels que: la souche productrice, la température, le pH et la composition du milieu **Abriouel et al., 2001; Mataragas et al ;(2003)**. Les facteurs supplémentaires ajoutés dans le milieu de culture, tel le glucose, le magnésium, ainsi que les conditions de culture, peuvent également affecter la production des bactériocines. En effet, la production de bactériocines peut être augmentée si la cellule productrice est stressée, du point de vue nutritionnel ou écologique (**Riley et Chavan, 2007**).

De plus, il a été observé que, l'effet inhibiteur, des souches lactiques, était

significativement différent selon le type de la paroi Gram, paradoxalement, il est plus important contre les bactéries indicatrices à Gram⁻ que contre celles à Gram⁺.

En règle générale, les bactériocines des bactéries lactiques, ne sont pas actives contre les bactéries à Gram⁻. Ceci est peut-être dû à la différence dans l'épaisseur et la composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram⁺ et Gram⁻. Toutefois, certaines études ont suggéré qu'un changement des propriétés de perméabilité de la membrane externe suite à certains traitements utilisés en combinaison avec des bactériocines ou encore des conditions de stress rendraient les bactéries Gram⁻ sensibles aux bactériocines (**Abee 1995; Cintas et al., 2001; Deegan et al., (2006).**

Les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques (**Onda et al., 2003**). Les bactériocines sont, surtout, actives sur les pathogènes à Gram⁺ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Biswas et al, 1991**).

En outre, **Thuahault et al ;(1991); Jack et al ;(1995) ;Onda et al;(2003)** confirment que les bactéries Gram⁺ sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques. Ceci laisse suggérer, que nos souches lactiques, ont agit par, des bactériocines inhabituelles voir atypiques ou par un mécanisme autre que la production de bactériocines, ce qui n'exclut pas la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de diacétyl et d'autres composés aromatiques et/ou substance inhibitrices (**Deegan et al., 2006**).

conclusion

Conclusion :

La production de laits fermentés (yaourts) représente une technologie complexe, qui fait intervenir différents facteurs : en premier lieu, des facteurs biologiques, associés à la mise en œuvre d'une matière première d'origine vivante : le lait, et à sa transformation par des micro-organismes, les bactéries lactiques ; en second lieu, des facteurs d'ordre technologique, liés à la mise en œuvre de différentes opérations unitaires. Cette complexité permet des combinaisons très diverses, ce qui aboutit à l'élaboration de produits très variés.

Les contraintes de la qualité, à la fois physico-chimiques, hygiénique, organoleptique et nutritionnelles, doivent, en outre, impérativement être prises en compte.

Notre étude portée sur douze échantillons du yaourt industriel, dont deux sont des laits fermenté acidifiés :

Les testes physico-chimiques ont montré, leur conformité aux normes requises, sauf une faible viscosité enregistrée pour certains échantillons (E6) et (9.75) et échantillons (5) (10).

L'évaluation de la qualité microbiologique, pour l'ensemble des échantillons, a montré leur bonne qualité bactériologique et leur conformité aux normes nationales.

Les dénombrements des LAB, ont montré une prédominance des espèces *Streptococcus thermophilus*, ceci semble relatif aux caractères physiologiques, biochimiques et génétiques de l'espèce.

Les différents tests d'antagonisme, conduit sur le milieu Muller-Hinton, ont montré, des effets inhibiteurs des surnageant bruts actifs, relatifs aux isolats lactiques, contre des souches cibles, à Gram positif(S8), négatif(S3et S5)et même contre la levure pathogène *Candida albicans*(11), ce qui a prouvé que nos souches, sont productrices de métabolites bioactifs, ayant large spectre d'activité contre des Procaryotes et des Eucaryotes, ceci ouvre les perspectives pour leur expérimentation et/ou exploitation dans la conservation des aliments.

Perspectives

Perspectives

La présente étude n'est qu'une contribution et les résultats rapportés, ne sont que partiels et primordiaux, ces derniers, ouvrant des perspectives en domaine de recherche fondamentale (académique) et appliquée, méritent d'être approfondis, surtout par réalisation des étapes suivantes :

- Elargissement d'effectif des échantillons des yaourts industriels et traditionnels
 - Identification des souches lactiques thermophiles par la technique PCR (Amplification des régions d'ADN ITS et 16S).
 - Dosage comparatif des composés aromatiques (notamment le diacétyl et l'acétaldéhyde) dans les différentes marques des échantillons par la technique HPLC.
- Exploration comparative, des potentialités aromatiques, en culture pure et mixte, en présence des espèces lactiques thermophiles et mésophiles, sur différents systèmes de fermentation industrielle.
- Réalisation des investigations, en vue d'extraction, purification et caractérisation d'éventuelles bactériocines à partir des souches lactiques dénombrées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

- Abdelmalek A, Bey F, Gheziel Y, Krantar K, AitAbdeslam A., Meribai A; Medouakh L and Bensoltane A. (2009).** Viability and resistance to acidity of *Bifidobacterium* sp in Algerian's Bio-yoghurts. *Egypt.Jo.ofAppl. Sci*, 24 (2A), 193- 201.
- Abee T. (1995).** Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protect mechanism producer organism. *FEMS Microbiol. Letters*. 129, Pp: 1-10.
- Abou-Donia S.A. (1986).** Egyptian fresh fermented milk (review), Newzealand. *Journal of Dairy Science and Technology*. **19**, 715.
- Abriouel H.E., Valdivia,A., Maqueda., M. (2001).** Influence of physico-chemical factors of the oligomerization and biological activity of bacteriocis AS-48. *Curr Microbiol*. 42,Pp: 89-95.
- Accolas J.P., Blooquel R., Didienne R. & Regmier J. (1982).** Acidifying, properties of thermophilic lactic bacteria in relation to yougurt productions. *Industria lechera*, **62**,14- 16.
- Ait-Belgnaoui A., (2006).** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. *INRA*,5pp : 3- 152.
- Almeida K.E, Tamime A.Y and Oliveira M.N (2009).** Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT- Food Science and Technology* 42 (2009) 672– 678 A-research note.
- Amoroso M.J., Nanca de Nandra M.C. (1990).** Microbiologie, Aliments, Nutrition, Pp 10.
- Angelov M., Kostov G., Simova E., Beshkova D. & Koprinkova-Hristova. (2009).** Protocoopération factors in yoghurt starter cultures. *Revue de Génie Industriel* 3, 05- 12.
- Angelov M., Kostov G., Simova E., Beshkova D. & Koprinkova-Hristova. (2009).** Oxygen influence in the mutual metabolism of *St. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* in yogurt starter cultures, <http://www.revue-genie-industriel.info/>.
- Anonyme (1995) .** le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine .*Collection FAO : Alimentatoin et Nutrition*. 28.

- Ashraf R. et Smith S.C (2015).** Selective enumeration of dairy based strains of probiotic and lactic acid Bacteria. *International Food Research Journal* 22(6), Pp: 2576- 2586. Journal home page:<http://www.ifrj.upm.edu.my>.
- Aslam S.et Qazi, J.I. (2010).** Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool.* 42(5), Pp:567-573.
- Béal C. &Corrieu G. (1991).** Influence of pH, temperature, and inoculum composition of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 90- 98.
- Béal C. et Sodini I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire, Doc. F6315.
- Béal C., Spinnler H.E. &Corrieu G. (1994).**Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius*ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii*ssp. *bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, pp: 95-98.
- Bear, C. &Corrieu, G. (1998).** Production of thermophilic lactic acid starters in mixed cultures. *Lait*, 78, 99-105.
- Bennama R, Rechidi- Sidhoum N AND Bensoltane A (2011).**Effect of Threonine on Growth and Acetaldehyde Productionby *Streptococcus thermophilus**World Applied Sciences Journal* 15 (2): 160- 163.
- Bernardeau M., Vernoux JP., Henri-DubernetS etGuéguen M. (2008).**Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology.*126, Pp: 278– 285.
- Betoret, N., Puente L., Díaz M. J., Pagán M.J., García, M. J., Gras M.L., Martínez-Monzó J. and Fito P., (2003).** Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation.*Journal of Food Engineering.*,56Pp : 273-277.
- Biswas S.R., Ray P., Johnson M.C., Ray B. (1991).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocinAcH, by *Pediococcusacidilactici*H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4), 1265-1267.
- Breslaw ES. Kleyn DH (1973).** In vitro digestibility of prote in in yogurt at various stages of processing.*J Food Sei* 38. 1016-1021 .
- Chamba JF & Prost, F (1989)** Mesure de l'activité acidifiante des Bactéries lactiques, thermophiles pour la fabrication de fromage à pâte cuite. *Lait*, (69), 417-431.
- Chaves A.C.S.D., RUAS- Madiedo P., Starrenburg M., Hugenholtz J & Lerayer ALS (2003).** Impact of engineered *streptococcus thermophilus* strains overexpressing *glyA* gene on folic acid and acetaldehyde

production in fermented milk. *Brazilian Journal of Microbiology* (2003) 34 (suppl.1):114- 117- ISSN. 1517- 8382.

- Chaves A. C. S. D, Fernandez M, Lerayer A. L. S, Mierau I, Kleerebenzem M, AND Hugenholtz J (2002).** Metabolic Engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophiles* *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 2002, p. 5656– 5662 Vol. 68, No. 11.
- Chomakov H. (1987).** Bulgarian yogurt– health and long living, Zemizdat”(Ed.), Sofia, (in Bulgarian).
- Cintas L.M., Herranz C., Hernández P.E., Casaus M.P., Nes I.F. et Hernández, P.E. (2001).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7, Pp: 281-305.
- Corrieu G. et Luquet F-M., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques, édition Tec. et Doc.Lavoisier, Paris France, pp : 307.
- Courtin P AND Rul F (2004).** Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model, *Lait*, 84:125– 134.
- Da Cruz A G., Faria J A. F et Van Dender A. G. F. (2007).** Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40, Pp: 951- 956.
- Davis J.G.(1971).** Enumeration and viability of *L.bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts, *Dairy Industry*. 36, 569- 573
- De Man JC, Rogosa M. and Sharpe M.E (1960)** A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Jo. Appl. Bacteriol*, 23: 130- 135.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. et Ross, P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy. Jo.*16, Pp: 1058- 1071.
- Degeest B., Mozzi F., De Vuyst L. (2002).** Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 79, Pp: 161– 174.
- Delorme C(2008).** Safety assessment of the dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 126, Pp 274 – 277.
- Desmazeaud M. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactique. *Le lait*. 63, Pp: 286-310.

- Dortu C. et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13, Pp: 143-154.
- Driessen F.M. & Kingma F. (1982).** Standhouders J. Hol yougurt bacterien alkaar helpen grocien, *Zuivelicht* , 74, 176- 178
- Driessen F.M. (1981).** Protocooperation of yogurt bacteria in continuous culture In: *Mixed Cultures Fermentation*. M.E. Buchell, J.H.Slater (Eds.). Academic Press. New York. Pp.99- 120.
- Eck A. and Gillis J.C. (1997).** Le fromage : De la science à l'assurance- qualité. Eck A., Gillis J. (Eds.). Lavoisier. New York.
- El-Sharoud W.M., Delorme C., Darwish M.S et Renault P. (2013).** Genotyping of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Egyptian dairy products by sequence analysis of the phosphoserine phosphatase (ser B) gene with phenotypic characterizations of the strains. *Journal of Applied Microbiology* ISSN Pp: 1364-5072.
- Ernest J.M. (1990).** Youghurts, part 1. *Dairy Industries International*, 55, 40- 41.
- FAO/ OMS, (2001).** World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: 34.
- Flejtas O. & Gruev P. (1977).** Comparative performance of industrial and new isolated strains of *L. bulgaricus* with respect to acid formation properties, *Scientific works of HIFFI* , 24(1) (in Bulgarian).
- Fuller R., (1989).** Probiotics in man and animals. *Jou. Appl. Bacteriol.*, 66 Pp:365- 78.
- Gaudichon C, Roos N, Mahé S, Sick H, Bouley C, Tomé D (1994).** Gastric emptying is a major regulatory system of nitrogen absorption kinetic of [15N]-labelled milk or yogurt in miniature pigs. *J. Nutr* 124, 1970-1977 .
- Gezginc Y, Akyol I, Kuley E, Özogul F (2013).** Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. *Food Chemistry* 138 (2013) 655- 662.
- Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond- Bourget N., Decaris B, Bolotin A., Delorme C., Ehrlich D., Guedon E., Monnet V., Renault P et Kleerebezem M (2005).** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative. *FEMS. Microbiology. Reviews*, (29), Pp: 435– 463.

- Irkin R & Eren U.V (2008)** A research about viable *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* numbers in the market yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 3 (1): 25- 28.
- Iyer R, Tomar S. Kapila S, Mani J AND Singh R (2010).** Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International* 43 (2010) 103– 110.
- Izquierdo E., (2009).** Les protéines bactériennes entant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat, *Université de Strasbourg* :Pp : 8- 141.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995).** Bacteriocins of Gram positive bacteria *Microb .Rev.* 59, Pp: 171- 200.
- Juillard V., Desmazeaud M. J. & Spinnler H.E. (1988).** Demonstration of urease activity in *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, **34**, 818- 822.
- Kondratenko M.S., Gruev P. & Mutafova K.P. (1985).** *Bulgarian yogurt*, Zemizda (Eds.), Sofia, (in Bulgarian).
- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D., (2005).** Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, 98 Pp: 1303- 1315.
- Leory F., Degeest B. & De vuyst L (2002).** A novel aerea of predictive modeling: Describing the functionally of beneficial micro-organisms in foods. *International Jornal of Food Microbiologie* ,73 , 251- 259.
- Lilly D. M. and Stillwell R. H., (1965).** Probiotics: Growth- promoting factors produced by microorganisms. *Science*, Pp : 147- 747.
- Lompo L., Niculescu N., Broutain C., (2006).** Démarched'élaboration d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène: Maîtrisede la qualité dans la transformation laitière. – Ouagadougou :GRET44p.- Compte rendu atelier sous régional de restitution.
- Loones A, (1994).** Laits fermentés par les bactéries lactiques. *In* : Bactiries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. Pp 135- 154. Ed. De Roissart H, et Luquet, FM, Tome II. *Ed Lorica*.
- Luquet, (1985).** Lait et produits laitiers : transformation et technologie. *Ed. Techniques et Documentation Lavoisier* .633.
- Mahé S, Gaudichon C, Roos N (1994).** 15N-labeled milk and yogurt digestion and absorption in the human jejunum. 78e réunion FASEB, 25-28 avril, Anaheim, CA, USA. *FASEB J* 8, A 174.

- Marcel B.R., Coxam V. And Delzenne N., (2008).** Aliments fonctionnels. 2 Ed Tec. Et Doc. Lavoisier: 23- 1015.
- Margoles A. and Garcia L., (2003).** Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholera: A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 80 Pp :191- 198.
- Matalon M.E. & Sandine W.E. (1986).** *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and yogurt: A review. *Cult. Dairy Prod. Jo.* 21, 6-12.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M., Drosinos E.H. (2003).** Influence of pH and temperature of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci.* 64, Pp: 265-271.
- Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M (2002).** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12. Pp: 173- 182.
- Meribai A, Ait-Abdeslam A, Krantar K, Mahi M^{ed} , Benzeguir FM, Slimane N, Maghnia D, Mouadene R et Bensoltane A. (2010).** Biotechnological study of a thermophilic acid starter isolated from Algerian cow's raw milk. *Egypt. Jo Of Appl. Sci*, 25(4B), Pp: 243– 254.
- Meribai, A. Diafet, A. Bachene, A. Bahloul, M. Ouarkoub, S. Naami, M. Madaci, A. Bensoltane (2016).** Acetaldehyde and lactate production after long term freezing for three thermophilic wild streptococcus thermophilus strains: evaluation in single culture. Volume 32(4). Published August, 01, 2016 www.jnsiences.org E-ISSN 2286- 5314 WWW. JNSCIENCES. ORG Journal of New Science. Volume 35(7). Published November, 01, 2016. www.jnsiences.org. E-ISSN 2286-5314.
<http://www.jnsiences.org/agri-biotech/42-volume-32/232-acetaldehyde-and-lactate-production-after-long-term-freezing-for-three-thermophilic-wild-streptococcus-thermophilus-strains-evaluation-in-single-culture.html>.
- Meribai, A. Diafet, A. Bahloul, L. Ouarkoub, S. Naami, M. Mekhoukh, A. Bensoltane (2015).** Stabilité acide et viables starters , après conservation des yaourts industriels, commercialisés aux Nord –

Est d'Algérie. *Journal of New Sciences*. Volume 23(2).
Published novembre, 01, 2015. www.jnsciences.org ISSN 2286-5314. file:///C:/Users/HP%20630/Downloads/JNS_AgriBiotech_Vol_23_2.pdf .

- Mora D, Majuin E, Masiero M, Parini C, Ricci G, Manacini P.L et Daffonchio D. (2004).** Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*. (96), Pp: 209- 219.
- Mostefaoui A, Hakem A, Yabrir B, Boutaiba S AND Badis A (2015).** Evaluation of biofilm formation by exopolysaccharide producer strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian camel milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2015. 27(6): 513- 521.
- Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Jo. Microbiol.* 88, Pp: 44-51.
- Norme ISO20128/IDF192 Mai (2006)** Produits laitiers dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.
- Norme ISO7889/IDF117 Février (2003)** Yaourt Dénombrement des micro-organismes caractéristiques Technique de comptage des colonies à 37°C.
- Oliveira D.R P, Perego P, Converti A AND DE oliveira M N (2009).** Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Engineering* 91 (2009) 133– 139.
- Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003).** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. Strain GM005, isolated from Miso-paste. *International Journal of Food and Microbiology*. 87 (1-2), Pp: 153-159.
- Ott A, Germond J.E AND Chaintreau A. (2000).** Vaccinaldiketone formation in yogurt 13 (C) precursors and effect of branched chain amino acids. *Jo. Agri. Foo. Chem.* 48,(3): 724- 731
- Ott A, L.B. FAY, AND Chaintreau A. (1997).** Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Jo. Agric. Food Chem.* 45: 850– 858.

- Pette J.W. & Lolkema H. (1951).** Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **4**, 197- 208.
- Poznanski S, Lenoir J, Mocquot G (1965)** La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Lait* 45, p3-26 .
- Radke-Michell L. & Sandine W.E. (1984).** Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review, *Journal of Food Protection*. **12**, 383- 391.
- Radke-Michell L. & Sandine W.E. (1986).** Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of Dairy Sciences*. **69**, 2558- 2568. Raton LA, USA: CRC Press : 1-16.
- Rasic J, Curcic R, Stojsavljevic T, Obradovic B (1971).**A study on the amino acids of yoghurt. *Milchwissenschaft* 26, 496-499 Ratcliffe B, Cole CB, Fuller R, New por.
- Riley M.A. et Chavan M.A. (2007).** Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, In: *Bacteriocins: Ecology and Evolution* , Riley, M.A., Chavan, M.A. (Eds.), pp. 5-18, ISBN 3-540-36603-2, Heidelberg, Germany.
- Rodriguez J.M., Martinez M.I., Kok J. (2002).**Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria .*Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 42, Pp: 91-121.
- Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S. and Mattila-Sandholm T., (2000).** Gut bacteria and health foods: the European perspective. *Int. J. Food Micr.*, 78 Pp: 99- 117.
- Saint-Eve A, Le´vy C, Le Moigne M, Ducruet V & Souchon I (2008).**Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials *Food Chemistry*, 110, Pp: 285– 293.
- Sanz Y. (2007).** Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strain *International Dairy Journal*, 17 (11) Pp: 1284- 1289.
- Saxelin M., Korpela R. and Mayara-Makinen A.(2003).** Functional dairy products. *Boca*
- Schmidt JL., Tourneur c & Lenoir j . 1994.** fonction et choix des bactéries lactiques laitières. In *bacteries lactiques* . pp 37-46. ed de roissart , h. et luquet,

FM,II ., lorica , paris .

Seydi M.(2002). Le lait fermenté type yaourt ou yoghourt : EISMV/ HIDAOA.- 5p.

Simova E. PhD. (2007). Thesis, Theoretical and application aspects of milk products starter cultures, NIHFI, Plovdiv, p. 391 (in Bulgarian).

Sing sudher K. Ahmed syed U. Ashkor P. (2006). Yougurt science and technologie , 2 nd Ed.Cambridge, woodhead publishing .*Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Egypatian dairy products by sequence analysis of the phosphosérinephosphatase (ser B) gene with phenotypic characterizations of the strains. *Journal of Applied Microbiology* ISSN Pp: 1364-5072.

Tabasco R, Paarup T, Janer C, Pelaez C et Requena T (2007).Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii sub sp bulgaricus* *Lb acidophilus* *Lb paracasei sub sp paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17,Pp: 1107- 1114.

Tagg J.R. et MC Given A.R. (1971). Bacteriocin activity can be detected and assayed by a modification of the punch hole *Method. Appl. Micro.* 21 (5), Pp: 943.

Tagg J.R., Dajani A.S., Wanamaker L.W et Gray E.D. (1973). Group (A) *Streptococcus* bacteriocins. *The Journal of Experimental. Medecine*, 11, 138, Pp: 68-1183.

Tamime A.Y & Robènson R.K. 1999. Yougurt science and technologie , 2 nd Ed. Cambridge, woodhead publishing .

Tamime A.Y., Robinson R.K. (2003). *Yogurt: Science and technology*, CRC Press, New York, p. 661.

Tammam J.D., Williams A.G., Noble J. & Lloyd D. (2000). Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* ssp. isolated from Cheddar cheese, *Letters in Applied Microbiology*, 30,370-374.

Tarzaghi BE, and Sandine WE, (1975) Improved medium for lactic *Streptococcus* and their bacteriophages, *Appl. Microbiol*, 29:807- 813.

- Thompson J. K., Collins M. A. et Mercer W. D. (1996).** -Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(3), Pp: 338 - 348.
- Thuault D., Beliard E., Le Guern, J. et Bourgeois C.M. (1991).** Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *Journal. of Dairy. Science.* 74(4), Pp: 1145-1150.
- Thunell R.K., Sandine W.E. (1985).** Types of starter cultures. In *Bacterial starter cultures for foods*. S.E. Gilliland (Eds.), CRC Press, Florida, 127-132.
- Valero E., Vilamiel M., Miralles B., Sanz J. A. N. D. Martone Z.-Castro I. (2001).**
Changes in flavor and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry* 72(2001)
Food Chemistry 72(2001).
- Wu Q, Tun H M, Chi-Ching L F and Shah N P (2014).** Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Scientific Reports* 4: 4974 | DOI: 10.1038/srep 04974.
- Yaygin H. (1970).** Recherches sur les températures optimales de développement de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* et influence de quelques facteurs sur leurs activités communes. *Le Lait*, **49**, 439-445.
- Zisu B et Shah NP (2003).** Effect of pH, temperature, supplement with whey protein concentrate and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*. 86, (11), Pp: 3405-3415.
- Zotta T., Ricciardi A., Ciocia F et Rossano R. (2008).** Diversity of stress responses in dairy thermophilic *Streptococci*, Eugenio Parente. *Int. Jo. of Food. Microbiology*. 124, Pp: 34– 42.
- Zotta T., Ricciardi A., Mrossano R., Parente E. (2008).** Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 25(2008), 113– 119.

Annexes

Les Annexes

Annexes I :

1. Matériel lourd : Tout le matériel lourd utilisé durant cette étude est présenté dans le tableau suivant :

Matériel	Référence (marque)
Hotte microbiologique	STERIL-GEMINI (Italy)
Etuve	Memmert (Germany)
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J
Microscope optique	OPTIKA B-350 (Italy)
Hotte chimique	EQUEIP LABO
Bain marie	Memmert (Germany)
pH mètre	Inolab pH 730 (Germany)
Distillateur	BuchI Distillation Unit K-350 (Switzerland)
Réfrigérateur / Congélateur	Samsung®, Algérie
Vortex	Fisher Scientific FB 15024
Agitateur magnétique plaque chauffante	AGIMATIC-E
Bec benzène électrique	INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY eco, BecBenzèn
Densitomètre	ThermolactodensitomètreLauda®, model TD1C at 20°C
Conductimètre	Tertracon®325 (Allemagne)
viscosimètre	viscosimètre (RION VISCOTESTER VT-03F- Chine).

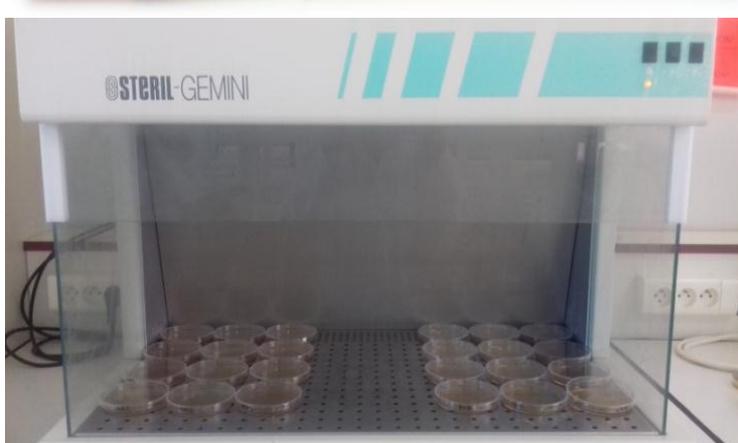
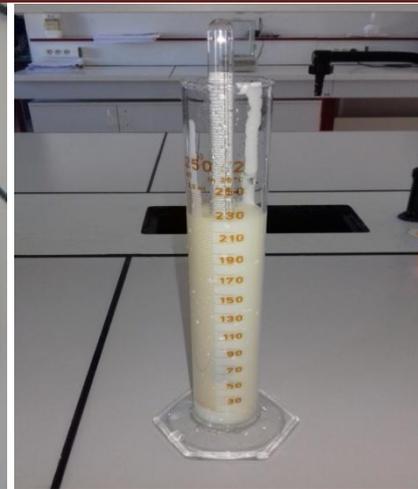
2. Matériel léger et accessoires

Les accessoires, matériel léger, produits chimiques et réactifs utilisés sont présentés dans le tableau 2 suivant :

Accessoires	Verrerie	Solvants	Colorants et réactifs	Sels et tampons
Anses de platine, Boîtes de Pétri, Cuillère, Distributeur, Micropipette, Ecouvillon, Pince, Rubans de paraffine, Scotch	Béchers, Entonnoirs, Eprouvette graduées, Erlenmeyers, Fioles Jaugé, Flacons, Lames/lamelles, Pipettes graduées, Pipettes Pasteur, Tubes à essai	Alcools (éthanol à 95°), Glycérol, Tween 80	Phénolphtaléine, Bleu de méthylène, Violet de Gentiane, Lugol, Fushine, Huile à émersion,	NaCl, NaOH,



Annexes



3. Matériel biologique

Souche indicatrices et de références

Milieux de culture(2)

Illustratif de composition de différents milieux de culture.

Milieu de culture	Composition	pH
Milieux solides		
Gélose MRS.	Polypeptone.....10g Extrait de viande.....10g Extrait de levure.....05g Glucose.....20g Tween 80.....01,08ml Phosphate bipotassique.....02g Acétate de sodium trihydraté.....05g Citrate d'ammonium.....02g Sulfate de magnésium.....0,05g Agar.....15,00g	05,9
Gélose M17.	Tryptone.....02,5g Peptone pepsique de viande.....02,5 g Peptone papainique de soja.....05,0 g Extrait autolytique de levure.....02,5 g Extrait de viande.....05,0g Lactose.....05,0 g Glycérophosphate de sodium.....19,0 g Sulfate de magnésium.....0,25 g Acide ascorbique.....0,50g Agar.....15,0g	ND
Mueller Hinton (MH).	Hydrolysate acide de caséine.....17,5g Extrait de viande.....03g Amidon.....01.5g Agar.....016g	07.3
Milieux liquides		
Bouillon MRS.	Dextrose.....20g Peptone bactériologies.....10g Extrait de bœuf.....08g Acétate de sodium.....05g Extrait de levure.....04g Phosphate di potassique.....02g Citrate d'ammonium.....02g Tween 80.....01ml Sulfate de magnésium.....0.2g Sulfate de manganèse.....0.05g Saccharose.....5g	05,9
Bouillon M17.	Tryptone.....02.5g Peptone pepsique de viande.....02.5g Peptone papainique de soja.....05.0g Extrait de viande.....05.0g Extrait autolytique de levure.....02.5g Acide ascorbique.....0.5g Glycérophosphate de sodium.....19g	ND

Annexes

	Sulfate de magnésium.....0.25g	
Bouillon cœur-cervele.	Protéose-peptone.....10g Infusion de cervelle de veau.....12.5g Infusion de cœur de bœuf.....05g Chlorure de sodium.....05g Hydrogénophosphate de sodium.....02.5 Glucose.....02g	7.4
Eau physiologique.	Chlorure de sodium.....09g Eau distillée.....1000ml	ND
Eau peptonnée	Sodium Glycérophosphate.....19.0g Peptone de soja.....05.0g Extrait de viande.....05.0g Lactose.....05.0g Peptone de viande.....02.5g Peptone de caséine.....02.5g Extrait de levure.....02.5g Acide ascorbique.....0.5g Sulfate de magnésium.....0.25g Agar bactériologique.....12.75g	ND
Lait écrémé reconstitué	Poudre du lait écrémé.....100.00g Eau distillée.....1000.00 ml	ND
Bouillon nutritif	Extrait de levure.....04g Tryptone.....05g Glucose.....50.0g Dihydrogénophosphate de potassium.....0.55g Chlorure de potassium.....0.425g Chlorure de calcium.....0.125g Sulfate de magnésium.....0.125g Chlorure ferrique.....0.0025g Sulfate de manganèse.....0.0025g Vert de bromocrésol.....0.022g	ND

ND*: Non Déterminé

Annexe II :

Mode opératoire de dosage du taux de protéine par la méthode de Kjeldahl

- Minéralisation

L'échantillon (la prise d'essai est de 0,5g pour la poudre de lait et 1g pour le yaourt) est introduit dans le tube de minéralisation (matras de 250ml) puis sont ajoutés, ce qui suit :

- deux comprimés kjeltabs (pour accroître la vitesse de conversion des matières azotés en sulfate d'ammonium);
- 15ml d'acide sulfurique très concentré (95%-98%);

Après avoir homogénéisé le contenu du matras, positionner le collecteur de fumées sur les matras et activer le scrubber. Les matras sont ensuite transférés sur le minéralisateur préchauffé à 420°C

La minéralisation dure 1h05mn, le minéralisât doit être limpide et exempt de matière non digérée. Après le refroidissement (15 à 20mn), le tube de minéralisation est placé sur le support du distillateur.

NB : le blanc doit être fait dans les conditions que les échantillons à analyser, avec 0,85g de saccharose, deux comprimés kjeltabs, 5ml d'eau distillée et 15ml d'acide sulfurique.

- Distillation

Le contenu du matras est dilué avec 80ml d'eau distillée, puis alcaliniser avec 70 ml de soude à 40%.

Le distillat est récupéré dans un erlen Meyer de 250ml, contenant 50 ml d'acide borique (H3B03 à 4%) destiné à fixer l'ammoniac

- Titrageacido-basique

l'ammoniaque piégé par l'acide borique contenu dans l'eren Meyer est titrée par un acide (HCl à 0,1N). L'ammoniaque augmente le pH de la solution et la quantité d'HCl rajoutée pour revenir au pH initial, détectée par l'utilisation d'un indicateur coloré (la couleur vire du bleu au rose), est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque. Le volume de l'acide est noté à 0,5ml près.

Annexe III :

Exploration In Vitro d'antagonisme entre isolats lactiques et souches pathogènes

On distribue un volume de 18ml du milieu Mueller Hinton (MH) autoclavé, qui sert comme support des interactions, dans des boîtes Pétri stériles et on ajoute un volume de bactéries indicatrices (préalablement réactivées) par deux méthodes soit par inondation, soit par écouvillonnage et on laisse diffuser 2 à 3 heures sous hotte microbiologique.

On dépose aseptiquement 4 disques du papier Watman sur la surface de la gélose MH et on les imbibe d'un volume de 10 μ l du surnageant brut actif (SBA) du milieu de culture de la souche lactique à l'aide d'une micropipette. On laisse diffuser 1h puis on les incube à 37°C pendant 48H.

Annexe VI : les textes législatif relatifs au normes de qualité du yaourt

JO 35/1998

GO 43/2004

GO42/2005