

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Biologie"

Spécialité: "Sciences des procédés biotechnologiques et agroalimentaires"

Présenté et soutenu publiquement par

TIFFOUR HADJIRA

CHEIKH SAMIRA

KARFAS FATIHA

EFFET DE COMPLEXE ARGILE DE MAGHNIA /BACTÉRIE LACTIQUE (*LACTOCOCCUSDIACETYLLACTIS*) SUR LE RENDEMENT ET LA QUALITÉ DES FROMAGESFRAIS

JURY:

-Président: M^{elle} Moulay.M, MAA

-Promoteur: Mr Hadj Saïd.A, MCA

-Examineurs:Mr Hocine.L, MAA

Année universitaire: 2013–2014

Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir mis sur le droit chemin pour pouvoir atteindre notre but à l'aide de notre promoteur **Mr. Hadj Saïd** pour nous avoir encadrés et conseillé pendant tout la réalisation de ce travail .

Nous adressons notre vifs remerciements à notre président **M^{elle} Moulay** qui nous a fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de travail et ses encouragement qui nous permis d'avancer dans l'élaboration de ce travail à qui nous témoignons notre profonde reconnaissance et à pour son aide précieuse ,son orientation et son conseil .

Nous remercions **Monsieur Hocine** qui à accepter d'examiner notre travail.

Nos remerciements s'adressent à tous les personnels de la bibliothèque, tous les responsables pour nous avoir facilité la collecte des données.

En fin, nous remercions tous ce qui a participé à la réalisation de notre travail de prés et de loi.

Dédicace

Je remercie tout d'abord Allah de m'avoir aidé à réaliser ce travail

Je dédie à tous ceux qui me sont chers :

*Mes très chers parentes qui ont toujours été là pour moi, pour les
quels je dois mon existence et ma réussite, je leur souhaite une long
vie pleine de santé heureuse*

A tous les membres de la famille CHEIKH

*Mes grand frères : Mohamed ,Amar,Houari , Baghdadi ,Aimen,
Oussama ,Adem*

*A tous mes petits chers frères : Fouad ,Yacine,Walid,Abdel nour et
Amine*

*Mes sœurs Zahra, Siham, Noura, Ikram , fatima ,Houaria
,Melouka , Manel*

Mes oncles Djebbar Madani Mohamed,et son familles

Mes tantes : Mira,Dhaiba ,Yamina

*Mes plus chers amis Hadjira,Fatiha
,Afaf,Fatoum,Iman ,Hanan,Abla,Khaira ,zineb,*

Samira

Dédicace

Je remercie tout d'abord Allah de m'avoir aidé à réaliser ce travail

Je dédie à tous ceux qui me sont chers :

*Mes très chers parentes qui ont toujours été là pour moi, pour les
quels je dois mon existence et ma réussite, je leur souhaite une long
vie pleine de santé heureuse*

A tous les membres de la famille TIFFOUR

Mes frères : Tedjanni, Khouili, Azzedine, Karim, Djamal, yacine

Mes sœurs : Rekaya, Fatima

Mes tantes : Chahla, Mahdia et Fatima

*Mes plus chers amis: Samira, Fatiha
, Afaf, Fatoum, Hanan, Khaira, Abla, zineb, Ahlem et Aida*

Hadjira

Dédicace

Je remercie tout d'abord Allah de m'avoir aidé à réaliser ce travail

Je dédie à tous ceux qui me sont chers :

*Mes très chers parentes qui ont toujours été là pour moi, pour les
quels je dois mon existence et ma réussite, je leur souhaite une long
vie pleine de santé heureuse*

Mon mari Ahmed et sa famille

A tous les membres des familles KARFAS et Amir

*Mes grand frères :Mohamed ,Ahmed,Abdel hadi
,Belkacem,Yacine,Fouad*

Mes sœurs :Messauda,zineb,Khaira,Fatima,Fatiha

A tous mes petits chers frères : Amine,Islem,Iman,kawther,djinan

Mes plus chers amis:

Hadjira,Samira,Fattoum,Afaf,Khaira,Ahlem,Aida

Fatiha

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction

Partie Bibliographique

Chapitre I : Le lait

I.1. Définition du lait	02
I.2. Composition du lait	02
I.3. les propriétés physico-chimiques du lait.....	03
I.4. La coagulation du lait.....	03
I.4.1. Coagulation par voie acide.....	04
I.4.2. Coagulation par voie enzymatique	04
I.4.3. Coagulation mixte.....	04
I.5. Paramètres influant la coagulation.....	04

Chapitre II : Les bactéries lactiques

II .1.Définition.....	05
II.2.Habitat et origine des bactéries lactiques.....	05
II.3.Taxonomie des bactéries lactiques.....	06
II.4.Intérêt des bactéries lactiques.....	07
II.5. <i>Lactococcus lactis</i>	07

Chapitre III : les argiles et biofilm

III.1. Les argiles

III.1.1. Définition.....	08
III.1.2. Origine des argiles	08
III.1.3. Structure de minéraux argileux	08
III.1.4. Propriétés des argiles.....	08
III.1.5. La bentonite.....	09
III.1.5.1. Définition.....	09
III.1.5.2 .Application de la bentonite.....	09

III.2.LES BIOFILMS

III.2.1. Généralité.....	09
III.2.2. Définition.....	09
III.2.3. Formation des biofilms.....	10

Partie expérimental

Chapitre I : Matériels et Méthodes

I.1. Objectif de travail.....	11
I.2. Lieu et période de travail.....	11
I.3. Matériels et méthodes.....	11
I.3.1. Matériels.....	11
I.3.1.1. Appareillage.....	11
I.3.1.2. Verreries.....	11
I.3.1.3. Les produits.....	12
I.3.1.4. Milieu de culture.....	12
I.3.1.5. Origine de bactérie lactique.....	12
I.3.1.6. Bentonite de Maghnia.....	12
I.3.2. Méthodes.	13
I.3.2.1. Protocole expérimentale	13
I.3.2.2. Protocole de ré-identification de la souche.....	14
I.3.2.3. <i>Lactococcus lactis subsp.lactis biovar .diacetylactis</i>	15
I.3.2.4. Purification et identification de la souche.....	15
I.3.2.5. Ré-identification de l'isolat.	15
I.3.2.5.1. Test morphologique	15
I.3.2.5.1.1. Etude macroscopique.....	15

I.3.2.5.1.2. Etude microscopique.....	16
I.3.2.5.2. Test biochimique.....	16
I.3.2.5.2.1. Recherche de catalase.....	16
I.3.2.6. Conservation de la souche.....	16
I.3.2.7. Culture sur lait de Sherman.....	17
I.3.2.8. préparation de l'argile.....	17
I.3.2.9. Préparation de la souche.....	18
I.3.2.10. La fromage du biofilm.....	19
I.4. L'application dans la coagulation de lait.....	20
I.4.1. Protocole de la préparation de fromage frais.....	20
I.4.1.1. Préparation de fromage frais.....	21
I.4.2. Protocole des analyses des produits finis.....	22
I.4.2.1. Les analyses bactériologiques des fromages préparant.....	22
I.4.2.1.1. Préparation des échantillons	22
I.4.2.1.2. Préparation des dilutions.....	23
I.4.2.1.3. Dénombrement des coliformes	23
I.4.2.1.4. Dénombrement staphylococcus aureus.....	23
I.4.2.1.5. Dénombrement streptocoques.....	23
I.4.2.2. Quelques analyses physico-chimiques	23
I.4.2.2.1. pH.....	24
I.4.2.2.2. Détermination de l'acidité.....	24
I.4.2.3. Les analyses sensorielles.....	24

I.4.2.4. Calcul du rendement fromager.....	2
--	---

Chapitre II : Les résultats et discussions

II.1. Les résultats	25
II.1.1. Caractérisation macroscopique.....	25
-Sur milieu solide.....	25
-Sur milieu liquide	25
II.1.2. Test microscopique.....	26
II.1.2.1. Coloration de Gram	26
II.1.3. Caractérisations biochimiques.....	26
II.1.3.1. Test du catalase.....	26
II.1.4. Le type de fermentaire.....	26
II.1.5. Test de Sherman	27
II.1. 6. Résultats des analyses des produits finis	28
II.1. 6.1. Les analyses bactériologiques.....	28
II.1.6.2. Quelques analyses physico-chimiques.....	29
II.3.3. des analyses sensorielles.....	31
II.3.4. Résultat et discussion de rendement fromager.....	32

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

BaCl : Chlorure de barium

°D : Degré Dornic

ENOF : Entreprise Nationale des produits non Ferreux

EPS : exopolysaccharide

H₂SO₄ : acide sulfurique

Lc : *lactococcus*

Ln:*leuconostoc*

MRS : Man Rogosa-Sharpe

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

pH : Potentiel d'hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

µm : micromètre

Tableau 1 : Composition moyenne en g.L ⁻¹ des laits de différentes espèces animales.....	02
Tableau 2 : Composition du lait de vache.....	03
Tableau 3 : Caractéristiques de différentes espèces de bactéries lactiques utilisées pour la maturation en crèmerie.....	05
Tableau 4 : Les genres de bactéries lactique et leurs propriétés.....	06
Tableau 5 : Les résultats bactériologiques du différent fromage frais.....	28
Tableau 6 : Les normes algériennes des fromages frais (J.O.R.A)	29
Tableau 7 : Les résultats des analyses physico-chimiques du différent fromage préparés.....	30
Tableau 8 : évaluation sensorielle du fromage frais préparé.....	31

Figure 1 : structure des argiles	08
Figure 2 : protocole expérimental général.....	13
Figure 3 : les étapes ré-identification de la souche.....	14
Figure 4 : les étapes de préparation de l'argile.....	17
Figure 5 : la préparation de la souche.....	18
Figure 6 : la formation du biofilm.....	19
Figure 7 : la préparation des fromages frais traditionnels.....	20
Figure 8 : les analyses des fromages préparés.....	22

Photo 1 : Aspect des colonies des lactocoques obtenu après 24h d'incubation à 30°C sur milieu M17 solide.....	25
Photo 2 : Aspect de souche pure de <i>Lactococcus diacetylactis</i> en milieu M17 liquide après incubation de 24h à 30°C.....	25
Photo 3 : les Gram positif qui se présentent en forme de cocci disposé soit en paire ou en courte chaînette objectif ×100.....	26
Photo 4 : le type homofermentaire de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i> par l'absence de gaz dans la cloche.....	27
Photo 5 : Test de sharman.....	28

Introduction

Introduction

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée (**Larpent,1997**). C'est un substrat très favorable au développement des bactéries lactiques. Elles font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation.

Les bactéries lactiques forment un groupe très intéressant de microorganismes, qui se caractérisent par la capacité de fermenter les glucides en acide lactique, un acide faible favorable à la conservation et à l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments.

L'acidification est le rôle principal attendu des bactéries utilisées comme ferments. Celle-ci a pour but de la coagulation du lait (**Karam , 2007**).

Dans l'industrie laitière de nouveaux procédés utilisant la technologie des cellules immobilisées (**Ibrahim , 2004**) ont été étudiés dans la fermentation laitière pour la production du fromage frais,

Notre étude contribue à l'utilisation des matériaux argileux, elle sont utilisées dans le domaine de la santé, leur application interne concerne ainsi essentiellement la gastroentérologie ,et dans ce cas en utilisée comme un support en suspension avec la bactérie lactique (*Lactococcus diacetylactis*) pour la mise en place à des phénomènes d'adhésion, de la formation de biofilm. Dans ce cadre que nous avons voulu connaitre l'effet de l'utilisation de cette biofilm sur la coagulation du lait, le rendement et la qualité du fromage traditionnel, et cette technologie comparativement à ceux utilisant des systèmes à cellules libres.

Le fromage, dont il existe des centaines de variétés, est le plus ancien moyen de conservation de la qualité nutritionnelle du lait, l'étape clé de la réussite d'un fromage est la coagulation, qui se traduit par la formation d'un gel, résultat des modifications physico-chimiques intervenant au niveau, des micelles de caséines. Les propriétés du gel formé diffèrent selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage.

Partie

Bibliographique

Chapitre I

Le lait

I.1. Définition du lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le Congrès International de la Répression des Fraudes : « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpent, 1997**).

Le tableau -1-présent la composition moyenne du lait de quelques espèces, le lait de chèvre a une composition voisine du lait de vache, alors que celle du lait de brebis est nettement différente.

Tableau 1: Composition moyenne en g.L⁻¹ des laits de différentes espèces animales (**Abiazar, 2007**).

Lait de	Protéines Totales	Caséines	Lactose	Matières grasses	Minéraux Totaux
Vache	32	28	40-60	39	9
Brebis	55	45	47	71,9	9
Chèvre	28	23	44-47	33,8	5-8
Chamelle	30	28	33	53,8	7

I.2. Composition du lait

La composition moyenne du lait de vache de race laitière, on voit que c'est un liquide très aqueux mais dont la composition en glucides, lipides et protides est remarquablement équilibrée en matières sèche (MS) avec en plus une variété de sels minéraux, de vitamines et d'enzymes. L'énergie apportée est de 65kcal environ pour 100g de lait (**Charles et al., 2003**). Le tableau suivant représente les différentes quantités des constituants du lait.

Tableau 2 : Composition du lait de vache (Charles et al., 2003).

Composants	Gramme par litre
EAU	905
GLUCIDE (lactose) disaccharide	49
LIPIDES (97% sous forme triglycerides)	35
PROTEINE	
Protéines solubles	5.5
Caséines	27.0
SELS	9
Ions calcium	1.25
Ions phosphate	2.60
Citrate	2.00
Constituants divers : vitamines et autres	Traces

I.3. les propriétés physico-chimiques du lait

Les propriétés physico-chimiques du lait sont plus ou moins stables ; elles dépendent soit de l'ensemble des constitutions comme la densité, soit des substances en solution comme le point de congélation ou encore des concentrations en ions comme le pH (acidité).

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique ou la densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité. Ceci se résume comme suit :

- La densité du lait varie entre 1,028 et 1,035 pour une moyenne de 1,032 à 15°C.
- Le point de congélation peut varier de -0,530°C à -0,575°C avec une moyenne de -0,555°C.
- Le point d'ébullition est à 100,5°C.
- L'acidité est de 15 à 17°D dans des conditions normales.

L'acidité est mesurée en degré Dornic (°D). 1°D correspond à 1 mg d'acide lactique dans 10 ml de lait. Elle permet de juger l'état de conservation de lait (Belhadi, 2009).

I.4. La coagulation du lait

La fabrication du fromage nécessite une phase de coagulation du lait, qui permet d'expulsion plus ou moins, une grande partie de l'eau et de matière soluble (le sérum).

I.4.1. Coagulation par voie acide.

La coagulation par voie acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui transforme le lactose en acide lactique. Le pH du lait de fromagerie diminue avec la production d'acide. Ce qui provoque une solubilisation du phosphate et du calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséine. Ces dernières vont se lier entre-elles et former un gel cassant très friable et peu élastique (**Abakar, 2012**).

I.4.2. Coagulation par voie enzymatique

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytique, le plus souvent d'origine animale (**Romain et al., 2008**).

I.4.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaison conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite (**Romain et al ; 2008**).

I.5. Paramètres influant la coagulation

Plusieurs facteurs influencent la coagulation : parmi ces facteurs, on peut citer la concentration en enzyme, la température, le pH et la concentration en ions Ca^{+2} (**Ilboudo et al ., 2012**).

Chapitre II
Les bactéries
lactiques

II.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aéro-tolérants et ne possédant aucune catalase (**Raynaud, 2006**).

Elles sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans l'alimentation. Elles sont responsables de la fermentation de produits alimentaires, qu'ils soient d'origine carnée, laitière ou végétale (**Garry, 1999**).

Différentes espèces de bactéries lactiques sont utilisées pour la maturation en crèmerie. Les bactéries lactiques mésophiles sont formées de souches homofermentaires (*Lactococcus*) et hétéro fermentaires (*Leuconostoc*). Les *Ln. cremoris* et *Lc. Diacetylactis* sont utilisées afin de produire du diacétyle, substance principale de l'arôme du beurre. Les résultats sont mentionnés sur le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques de différentes espèces de bactéries lactiques utilisées pour la maturation en crèmerie

Organisme	Type de fermentation		Isomérase de l'acide lactique	Utilisation de citrate	Diacétyle à partir de citrate	Hydrolyse de l'arginine
	Homo.	Hétéro.				
<i>Lc.diacetylactis</i>	+	-	L(+)	+	+	+
<i>Lc.lactis</i>	+	-	L(+)	-	-	+
<i>Lc.cremoris</i>	+	-	L(+)	-	-	-
<i>Ln.creoris</i>	-	+	D(-)	+	+	-

II.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des aliments ensemencés par les végétaux. Elles se

développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**Hadef, 2012**).

II.3. Taxonomie des bactéries lactiques

Selon l'ancienne taxonomie, les bactéries lactiques regroupe douze genres (**Robert et Hutkins, 2006**) le tableau en de sous représente les genres des bactéries lactiques et leur propriétés. Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Zarour et al ., 2012**).

Tableau 4 : les genres de bactéries lactique et leur propriétés (**Robert et Hutkins, 2006**).

Genre	morphologie	Type de fermentation	Croissance à :		Croissance dans NaCl :		Croissance à pH		L'isomère
			10°C	45°C	6,5%	18%	4.4	9.6	
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Homo/Hétéro	±	±	±	-	±	-	D, L, DL
<i>Lactococcus</i>	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Leuconostoc</i>	Cocci	Hétéro	+	-	±	-	±	-	D
<i>Oenococcus</i>	Cocci	Hétéro	+	+	±	-	±	-	D
<i>Pediococcus</i>	Cocci(tétrade)	Homo	±	±	±	-	+	-	D, L, DL
<i>Streptococcus</i>	Cocci	Homo	-	+	-	-	-	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	Cocci(tétrade)	Homo	+	-	+	+	-	+	L
<i>Aerococcus</i>	Cocci(tétrade)	Homo	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	Bacille	Hétéro	+	-	-	-	-	-	L
<i>Enterococcus</i>	Cocci	Homo	+	+	+	-	+	+	L
<i>Vagococcus</i>	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Weissella</i>	Coccoid	Hétéro	+	-	±	-	±	+	D, L, DL

II.4. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments, leur utilisation a pour but de l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Ababsa, 2012).

- Dans le domaine thérapeutique

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire. Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées.

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (Ababsa, 2012).

II.5. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis est l'espèce la plus importante de toutes les bactéries lactiques surtout dans la fermentation alimentaire (Sanders et al., 1999).

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces. Pour la fabrication fromagère (cheddar, fromage frais ...) ou la fermentation de la crème, les trois espèces suivantes sont utilisées : *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *.lactis* biovar *diacetylactis* (Souid, 2011).

Chapitre III
Les argiles et
biofilm

II.1. Les argiles

III.1.1. Définition

Le terme argile fait référence à des matériaux minéraux constitués principalement de grains fins dont la taille est inférieure à deux microns. Les argiles constituent un des minéraux industriels les plus importants employés dans une grande variété d'applications. Ils appartiennent à la famille des silicates lamellaires (phyllosilicates) (**Assassi, 2010**).

III.1.2. Origine des argiles

Les argiles représentent 82% des roches sédimentaires provenant de la décomposition lente des minéraux primitifs tels que : feldspath, micas, amphiboles, pyroxène et constituant donc l'essentiel du complexe d'altération (**Bougdah, 2007**).

III.1.3. Structure de minéraux argileux

Les argiles sont constituées de minéraux dont les particules sont essentiellement des phyllosilicates avec des empilements de feuillets bidimensionnels silicates. Les feuillets qui constituent le motif de base de ces matériaux, sont formés par l'assemblage d'une ou deux couches de tétraèdres siliceux SiO_4 et d'une couche d'octaèdres alumineux, ferrifères ou magnésiens (**Amirouche, 2011**).leur structure est illustré dans la figure 1

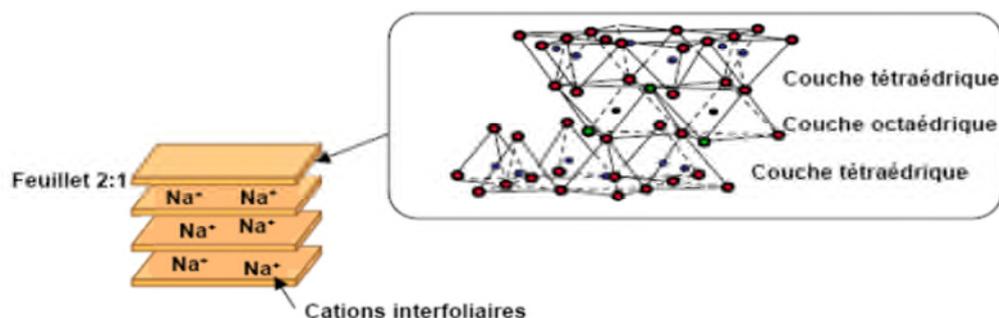


Figure1 : structure des argiles (**Yahiaoui, 2012**).

III.1.4. Propriétés des argiles

Les minéraux argileux se caractérisent par trois propriétés principales : leur forme et leur surface spécifique, leur capacité d'adsorption d'eau et de gonflement et leurs multiples possibilités d'échanges ioniques (**Amirouche, 2011**).

III.1.5. La bentonite

III.1.5.1. Définition

La bentonite est une roche argileuse, friable, tendre et onctueuse au toucher, sa teinte dépend des composés minéraux et impuretés qui lui sont étroitement associés. Elle est blanche, grise ou légèrement jaune. Elle se caractérise par une capacité élevée d'adsorption, d'échange ionique et de gonflement (**Chikhi, 2013**).

III.1.5.2. Les applications de la bentonite

Les bentonites ont de larges applications dans différents domaines (forage, fonderie, céramique, peinture, pharmacie, terres décolorantes,..., etc.). La majeure partie de la bentonite exploitée dans le monde est utilisée comme liant du sable de moulage, dans l'industrie de la fonderie et aussi pour épaissir les fluides de forage (**Chikhi, 2013**).

III.2. Les biofilms

III.2.1. Généralité

L'adhésion des microorganismes aux surfaces solides est un phénomène couramment observé dans l'industrie agroalimentaire ou le domaine médical. Cette adhésion peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de sante publique. Ainsi, pour déterminer le support et/ou les conditions (température, pH, force ionique, etc...) du liquide de suspension, les mieux adaptés à une contamination minimale et tester l'efficacité des produits de désinfection, il est nécessaire de réaliser des essais d'adhésion (**Larpent, 1997**).

III.2.2. Définition

Le biofilm est défini comme une « organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive adhérant à une surface ». Il est composé de cellules bactériennes et de leurs métabolites, avec une structure très poreuse (plus de 80 % d'eau) et comporte également une part importante de particules inorganiques piégées dans les exopolymères. Les biofilms peuvent également adhérer sur des surfaces minérales, végétales et animales (**Husson et al, 2010**).

III.2.3. Formation des biofilms

La fixation représente l'état prédominant des bactéries dans la nature. Elles colonisent les supports immergés et forment parfois un film de plusieurs dizaines de microns d'épaisseur (Georgios, 1988). La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués. La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes sont indiquées dans la Figure 2.

- Attachement réversible des bactéries.
- Adhésion irréversible et production d'EPS.
- Formation des micro-colonies.
- Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm.
- Détachement du biofilm.

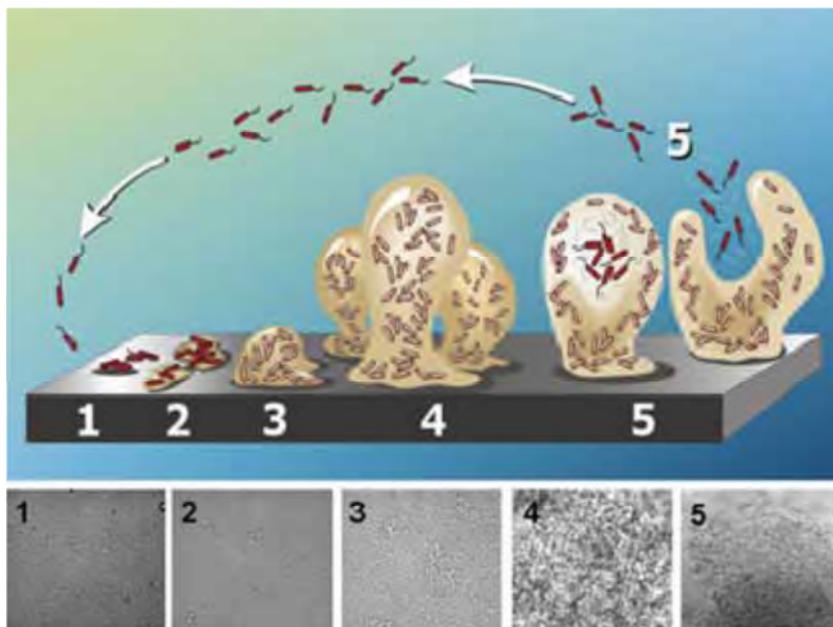


Figure 2. Les différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Parot, 2007).

Partie

Expérimentale

Chapitre I

Matériels et méthodes

I.1 Objectif de travail

Notre étude contribue à l'utilisation des matériaux argileux et de la bactérie lactique (*Lactococcus diacetylactis*) pour la mise en place à des phénomènes d'adhésion, de la formation de biofilm. Dans ce cadre que nous avons voulu connaître l'effet de l'utilisation de cette biofilm sur la coagulation du lait, le rendement et la qualité du fromage traditionnel.

2 Lieu et période de travail

Notre travail a été effectué durant la période allant du 26 février au 11 mai 2014, au laboratoire de microbiologie et technologie alimentaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

I.3 Matériels et méthodes

I.3.1 Matériels

I.3.1.1.Appareillages

- Autoclave
- Etuve
- Microscope optique
- Réfrigérateur
- Bain marie secouaire
- centrifugeuse

I.3.1.2 Verreries

- Tubes à essai
- Pipettes pasteur
- Lames
- Pipettes graduées
- Flacon de verre
- Béchers
- Eprouvette

Autres : Bec bunsen, tamis 50 μ m, barreau magnétique, spatule, portoirs, anse de platine boîtes de pétri, bac de coloration.

I.3.1.3 Les produits

- Solutions de coloration de Gram
 - Violet de gentiane
 - Lugol
 - Fuschine
 - Alcool
- Bleu de méthylène
- Eau distillée
- Eau oxygénée

I.3.1.4 Milieu de culture

- Milieu MRS
- Lait écrémé
- Milieu de chapman
- TGEA
- Rothe

I.3.1.5 Origine de la souche

La souche des bactéries lactiques «*Lactococcus diacetylactis*» provient du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran (Es-Senia). Elle a été isolée à partir du lait cru de chèvre.

I.3.1.6 Bentonite de Maghnia

La bentonite utilisée dans notre travail, nous a été offerte par l'entreprise fonderie de Tiaret. Elle provient d'un gisement près de Maghnia, située à l'ouest de Tlemcen. Elle est commercialisée par ENOF (Entreprise National des produits non ferreux) sous l'appellation de bentonite de fonderie.

I.3.2 Méthodes

I.3.2.1 Protocole expérimental

Pour étudier l'effet de biofilm sur la coagulation de lait, nous avons suivi le protocole expérimental général qui montre dans la figure 2.

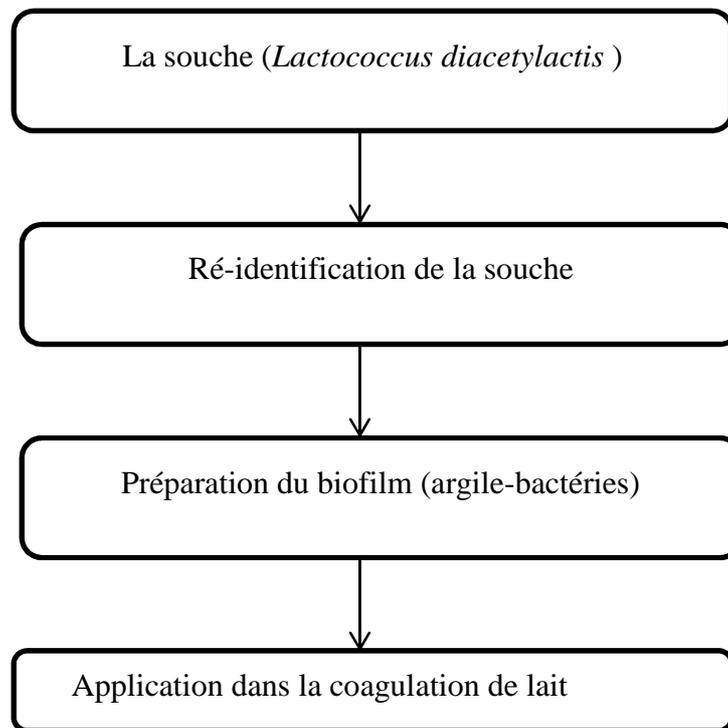


Figure 2 : protocole expérimental générale.

I.3.2.2 Protocole de ré-identification de la souche

La figure 3 montre les étapes de la ré-identification de la souche *Lactococcus diacetylactis*.

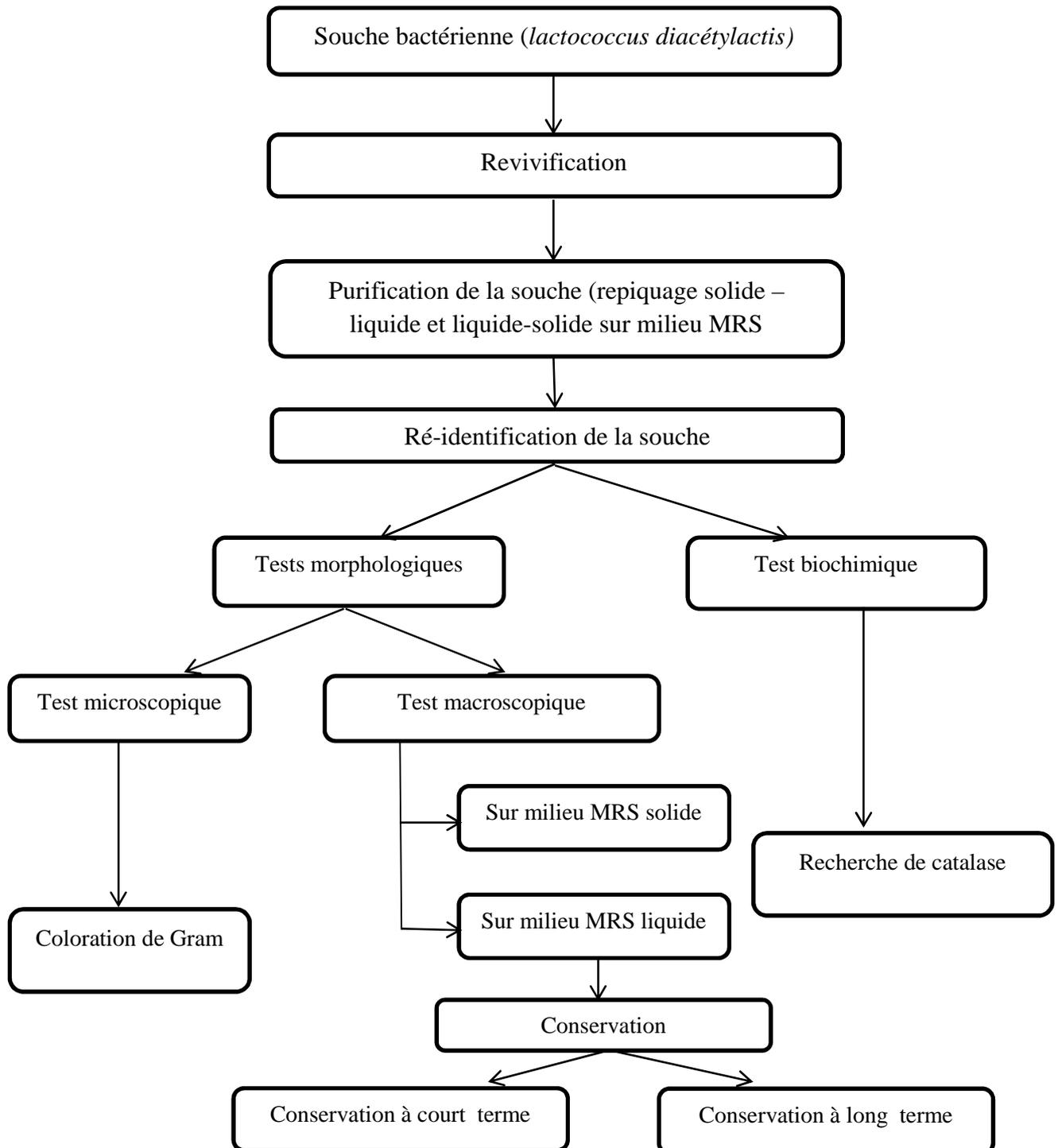


Figure 3 : Les étapes de la ré-identification de la souche

I.3.2.3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

C'est une bactérie lactique qui est caractérisée par une voie métabolique de l'utilisation du citrate, cette voie aboutit à la fermentation d'acétate, de CO₂ et de diacétyle, qui sont les composés aromatiques (Novel, 1993).

Cette souche est utilisée dans l'industrie laitière pour la fabrication de fromage. Cette souche contient des plasmides portant les gènes d'utilisation du lactose, et des gènes codant pour des protéases. Comme tous les biovar *diacetylactis*, elle contient également les gènes nécessaires à la production de diacétyle (Mansour, 2009).

I.3.2.4. Purification et identification de la souche

La purification de la souche est réalisée par trois repiquages successifs sur milieu MRS (liquide/solide et solide/liquide). L'utilisation des deux méthodes de l'ensemencement en milieu liquide et de stries en milieu solide ont permis l'obtention des cultures pures à partir des colonies bien séparées. Ces dernières doivent faire l'objet d'un contrôle macroscopique et microscopique avec la coloration de gram pour vérifier la pureté des souches (Moulay, 2006).

L'identification doit être établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : catalase, température de croissance et production de gaz carbonique (Labioui, 2005).

I.3.2.5. Re-identification de l'isolat

I.3.2.5.1. Tests morphologiques

I.3.2.5.1.1. Etude macroscopique

L'étude macroscopique permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide et sur milieu liquide. Sur milieu solide on décrit le type de colonies et on révèle la couleur, le pourtour, la forme ainsi que le diamètre.

En revanche sur milieu liquide l'aspect de la culture micro aérophile peut être d'un intérêt particulier. Cette estimation se base sur l'examen du trouble de la culture en milieu liquide (Moulay, 2005).

I.3.2.5.1.2. Etude microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif (Hadef, 2012). La technique de la coloration de Gram est indiquée en annexe N° 3.

I.3.2.5.2. Tests biochimiques de la souche

I.3.2.5.2.1. Recherche de catalase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries gram (+). Cette étude consiste à prélever une colonie et l'étaler sur lame avec une goutte d'eau oxygénée à 10V (Joffin et leyral, 2006).

D'après (Marchal et al., 1987), Si la souche examinée possède une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulle gazeuse, qui est expliqué par la décomposition de peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivant :



I.3.2.6 Conservation des souches

Les souches pures conservées selon deux méthodes différentes :

-Conservation de courte durée (à 4°C)

Les souches pures sontensemencées sur milieu M17 solide incliné et incubées à 30°C pendant 24h. Elles sont ensuite conservées à 4°C pour une période de quelques semaines (Boublenza, 2012).

-Conservation de longue durée (à -20°C)

Les souches pures sont cultivées sur lait écrémé stérile à 10% d'extrait de levure, et incubées à 30°C. Dès coagulation du lait, les cultures sont placées à -20°C pour une période de plusieurs mois. Les bactéries peuvent être conservées aussi dans leur milieu de culture additionné de 20% de glycérol stérile (Boublenza, 2012).

I.3.2.7. Culture sur lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h (Hadeff, 2012).

I.3.2.8. Préparation de l'argile

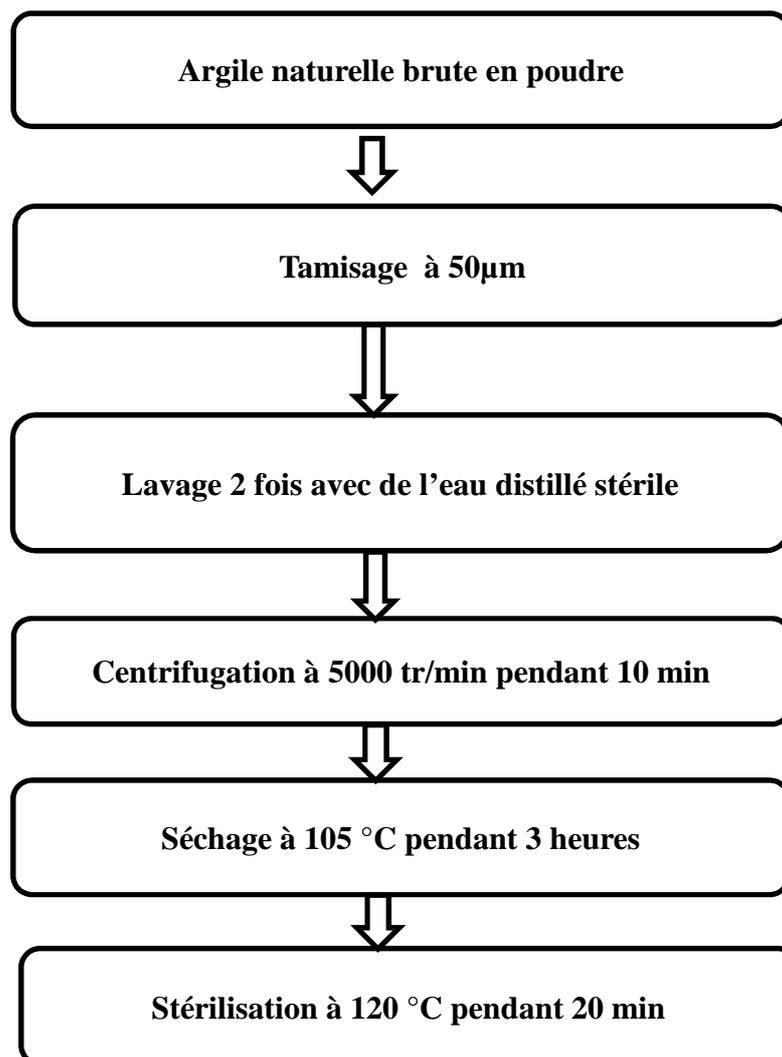


Figure 4 : Les étapes de la préparation de l'argile

La purification de l'argile permet d'éliminer les impuretés qu'elle contient. Seule la fraction tamisée à 50µm est utilisée, 8g de bentonite dans un bécher contient 400ml d'eau

distillée stérile puis agiter pendant 2 h et centrifuger à 5000tr /min pendant 10min. le culot est lavé deux fois successives par l'eau distillée suivie une centrifugation après chaque lavage.

Le culot va être séché dans l'étuve pendant 3 h à température de 105°C, broyer, tamisé par un tamis de 50µm et pesé et puis la stérilisation dans l'étuve à une température de 120°C pendant 20min.

I.3.2.9. Préparation de la souche (*Lactococcus diacetylactis*)

Selon Alexander et al, 2013, on a montré les différentes étapes de la préparation de la souche qui sont présentés dans la figure 5.

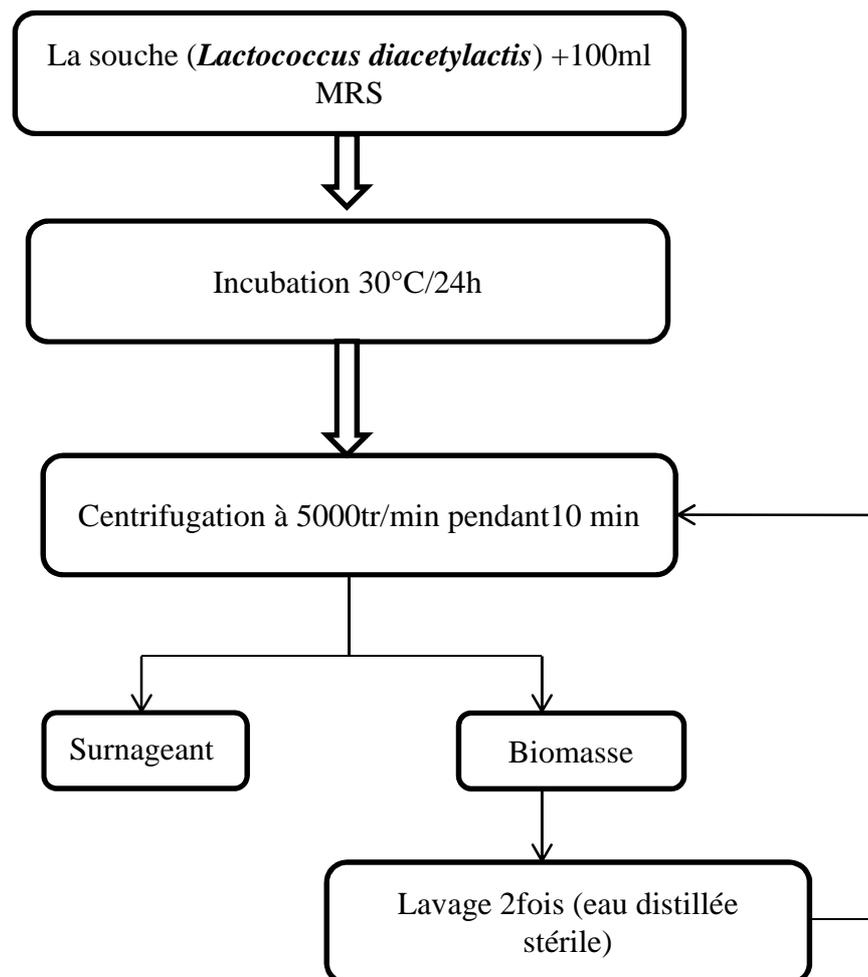


Figure 5 : La préparation de la souche

Ensemencer 1ml de la souche dans deux flacons stérile contenant 100ml MRS liquide, et après l'incubation à 30°C pendant 24h (culture jeune)

Centrifuger la culture jeune à 5000 tr/min pendant 10 min On conserve la biomasse après deux lavages successifs avec de l'eau distillée stérile et on élimine le surnageant.

I.3.2.10. La formation du biofilm

Les étapes de formation d'un biofilm sont appliquées selon (Alexander et al, 2013) qui sont indiqué dans la figure 6.

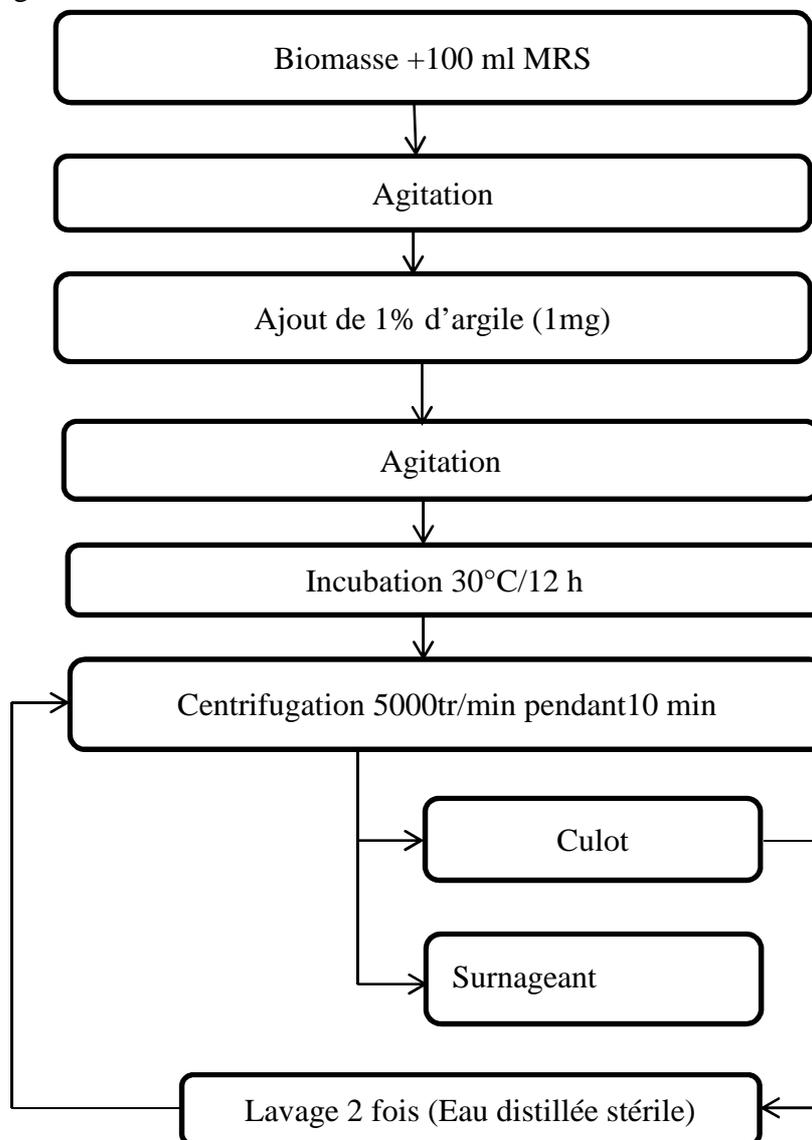


Figure 6 : Les étapes de la formation du biofilm

Selon Yann, 2003, L'immobilisation cellulaire résulte en des modifications physiologiques et morphologiques par rapport aux cellules en suspension.

I.4. Application à la coagulation de lait

I.4.1. Protocole de préparation du fromage frais à partir du lait cru pasteurisé

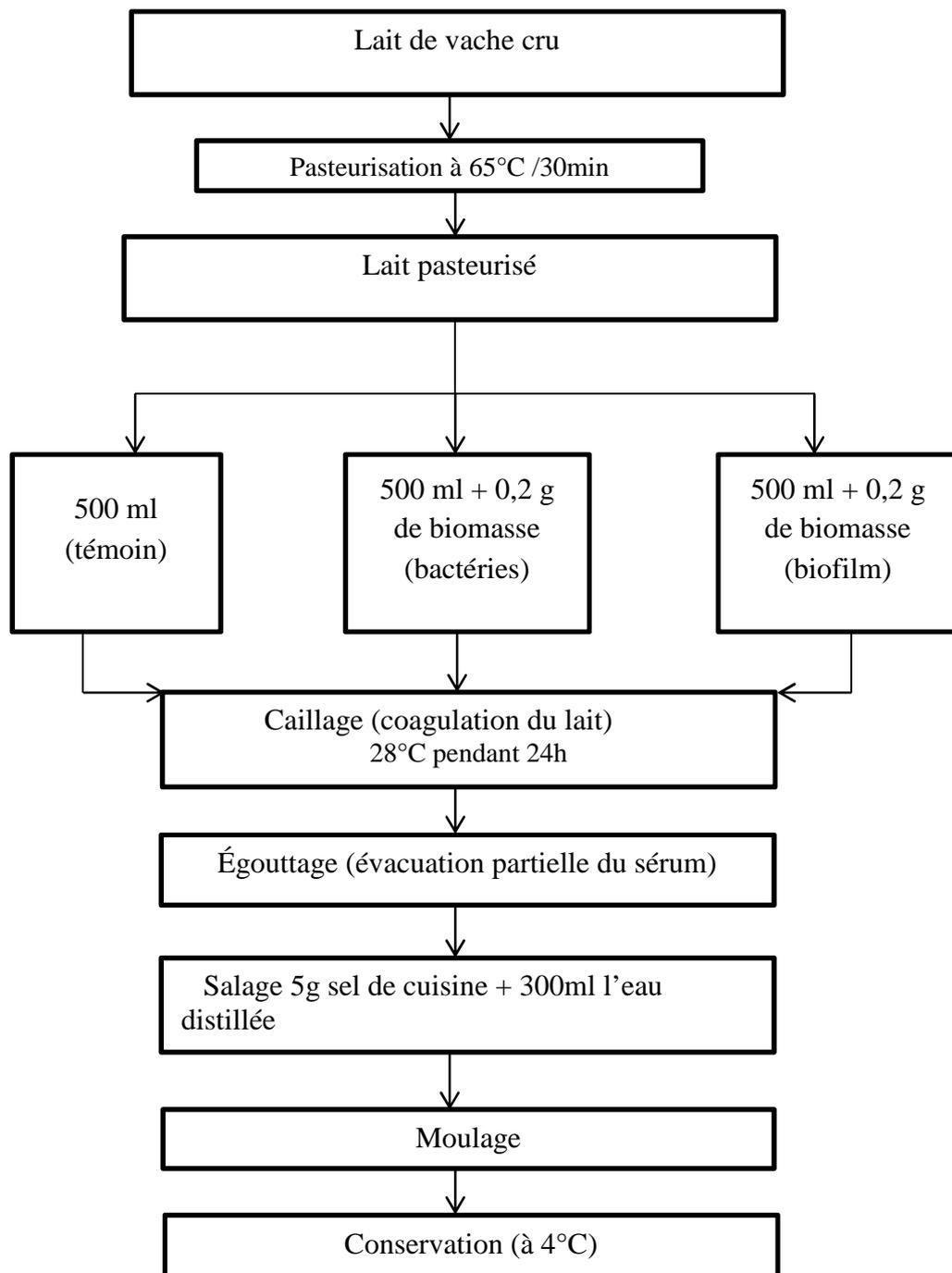


Figure 7 : la préparation des fromages frais traditionnels.

I.4.1.1. Préparation du fromage frais

Nous avons essayé de réaliser trois coagulation de lait de vache cru pasteurisé à partir de différents échantillons : la première c'est le lait (témoin) et la deuxième est une coagulation à partir de la bactérie (*Lactococcus diacetylactis*) et la troisième est une coagulation à partir de la biofilm (bactérie+ argile).

La préparation de chaque coagulation à partir de lait cru pasteurisé passe par les étapes suivantes :

-Caillage : coagulation de lait

-Egouttage : séparation du caillé et du sérum

-Salage : après l'égouttage, on place le fromage préparé dans un bécher contenant une solution de NaCl de la cuisine d'une concentration de 5g dans 300ml d'eau distillée stérile pendant 15min, puis on fait un deuxième égouttage.

-Moulage : pour donner la forme dans un moule

-Conservation : c'est une étape qui consiste à mettre le fromage préparé dans un réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'au moment d'analyses.

I.4.2. Protocole des analyses des produits finis

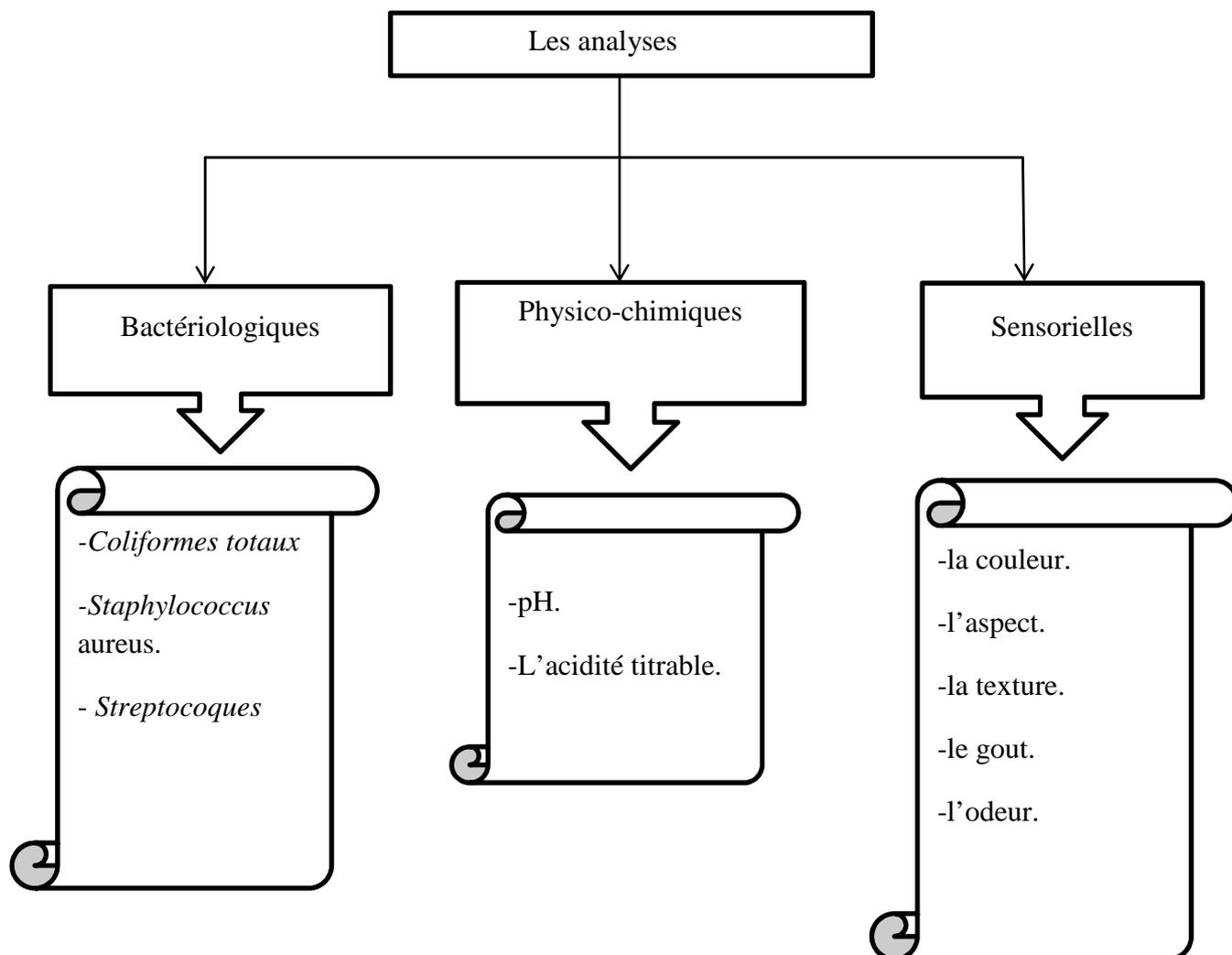


Figure 8 : Les analyses des fromages préparés

I.4.2.1. Analyses bactériologiques des fromages préparés

Les techniques appliquées dans notre travail sont celle mentionnées dans la microbiologie alimentaire.

I.4.2.1.1. Préparation des échantillons :

Pour chaque type de fromage préparé 1^{er} échantillon (témoin) ,2^{eme} échantillon (bactérie) ,3^{eme} échantillon (biofilm), on a prélevé une quantité de 4g et on complète à 40 ml

d'eau peptoné stérile, on a mélangé jusqu'à ce que le produit complètement disperse (1 min à 3 min) afin d'obtenir une solution mère 10^{-1} par rapport au produit de départ.

I.4.2.1.2. Préparation des dilutions

A l'aide d'une pipette graduée stérile, on introduit aseptiquement 1ml de la solution mère dans un tube à vis contenant 9 ml d'eau peptoné stérile, cette dilution correspond alors au 10^{-2} et en fin on prend 1ml de la dilution 10^{-2} avec une autre pipette stérile et verse dans un deuxième tube afin d'obtenir une dilution de 10^{-3} .

Les dilutions ainsi préparées sont agitées pendant quelques secondes.

I.4.2.1.3. Dénombrement des coliformes totaux

On utilise la gélose TGEA, l'ensemencement est en profondeur. On prélève 1 ml de chaque dilution (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) et met dans une boîte pétri, nous recouvrons ensuite avec le milieu préalablement liquéfié au autoclave et ayant une température 120°C , on mélange sous forme de 8 et on laisse solidifier. L'incubation s'effectue à 30°C pendant 24 à 48 heures pour les coliformes totaux.

I.4.2.1.4. Dénombrement des staphylococcus aureus

Verser le milieu de Chapman préalablement liquéfié à l'autoclave dans quatre boîtes pétri et laisser solidifier.

On dépose un volume de 0,1 ml de chaque dilution (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) dans la surface de la gélose contenant dans les boîtes pétri puis étaler à l'aide d'une pipette râteau. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 -48 heures.

I.4.2.1.5. Dénombrement des *Streptocoques fécaux*

Dans les laits et produits laitiers, les Streptocoques du groupe D ou Streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par technique du NPP. La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- *Le test de présomption* : réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe ;
- *Le test de confirmation* : réservé à la confirmation proprement dite sur milieu Eva

Litsky des tubes trouvés positifs au niveau des tests de présomption.

Chaque tube Rothe trouvé positif lors du test de présomption (présentant un trouble microbien)

fera l'objet d'un repiquage dans un tube de milieu Eva Litsky (**Lebres *et al.*, 2002**). Dans le test confirmatif, nous avons considéré comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien
- Une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube (**Leksir ,2012**).

I.4.2.2. Quelques analyses physico-chimiques

Les analyses réalisées sur les différents types de fromage frais préparé sont : la mesure de pH et la détermination de l'acidité titrable.

I.4.2.2.1. pH

Le principe consiste à la mesure directe du pH à l'aide d'un pH mètre, l'électrode de ce dernier et introduite dans la solution mère (étant 4g de fromage traditionnel dilué dans 40 ml d'eau distillée), en réglant le correcteur de température, la valeur du pH est lue directement sur l'échelle graduée du pH mètre (**AFNOR, 1986**).

I.4.2.2.2. Détermination de l'acidité titrable

La détermination de l'acidité titrable est basée sur le principe de titrage par l'hydroxyde de sodium (NaOH) en présence de phénophtaléine comme indicateur colore.

Dans le cas du fromage, on ajoute deux gouttes de phénophtaléine à 10ml d'une solution de fromage préparé (soit 4g de fromage frais dilue 40ml d'eau distillée), on titre avec la soude (0.111 N) jusqu'au virage de la couleur, on effectue la lecture à partir de la quantité de soude utilisée dans le titrage .l'acidité s'exprime en degré Dornic (°D).

I.4.2.3. Analyses sensorielles

Selon **hamama *et al.*, 1995**, les analyses sensorielles des fromages préparés a été évaluée par un jury de dégustation compose de 10 personnes qui ont été invitées à juger cette qualité selon une échelle de différents niveau d'appréciation : très bonne, bonne ; moyenne

I.4.2.4. Calcul du rendement fromager

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est défini par **Vandeweghe, 1997**, comme étant l'expression mathématique de la qualité de fromage obtenue à partir d'une quantité donnée de lait.

La mesure se fait à partir de la quantité de lait mise en œuvre (en litre) et du poids du fromage obtenu (en kg).

Chapitre II

Résultats et discussions

II.1. Caractérisation macroscopique

-Sur milieu solide : des colonies circulaires de petites tailles, blanchâtres ou légèrement jaunâtres à pourtours réguliers et lisses .Aspect macroscopique des colonies peuvent être observée dans la photo 1

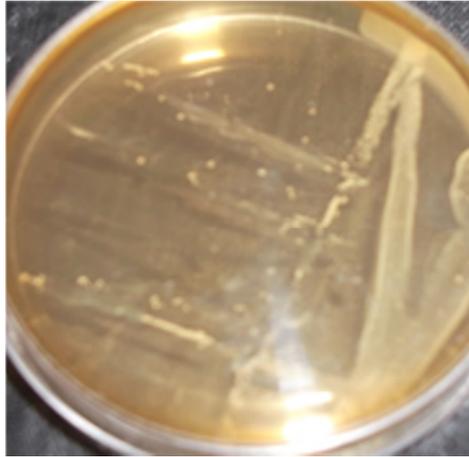


Photo1 : Aspect des colonies des lactocoques obtenu après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.

-Sur milieu liquide : le bouillon MRS présente une turbidité a un fort développement de la culture en profondeur ou la pression de l'oxygène est faible du au caractère micro aérophile de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* voir la figure

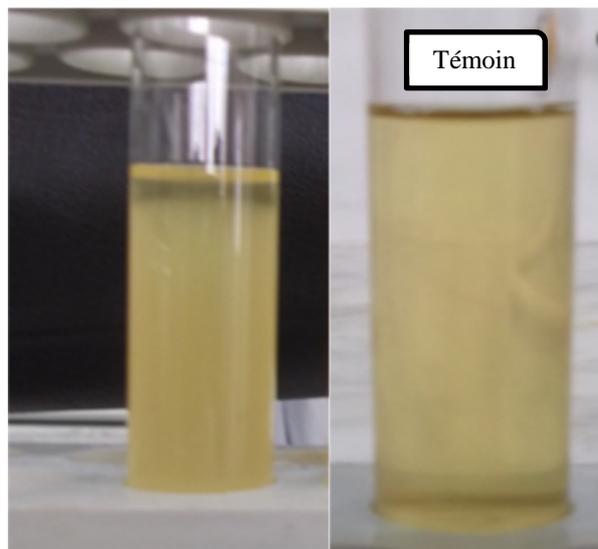


Photo2: Aspect de souche pure de *Lactococcus diacetylactis* en milieu MRS liquide après incubation de 24h à 30°C, la bactérie se développe mieux en profondeur ou la pression d'oxygène est faible (micro aérophiles).

II.2. Test microscopique

II.2.1. Coloration de Gram : la souche est une Gram positif qui se présente en forme de cocci disposés soit en paire, diplocoques ou en court chaînette.

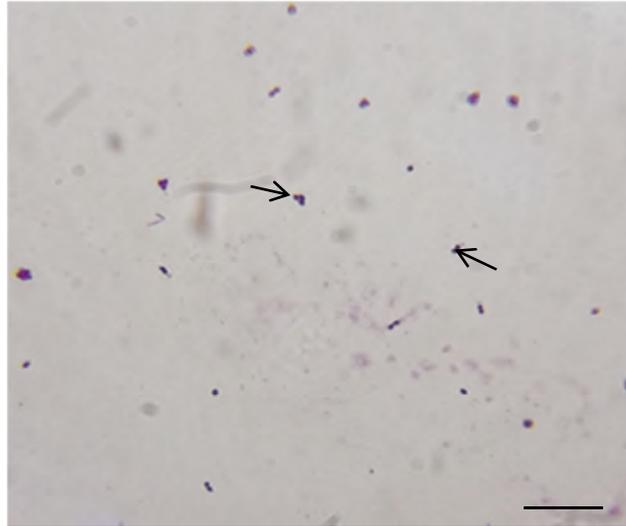


Photo3 : Aspect microscopique et l'arrangement de *lactococcus diacetylactis*

II.3. Caractérisations biochimiques

II.3.1. Test de la catalase

Selon les résultats on obtient un catalase négatif c'est-à-dire la souche bactérienne ne possède pas une activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. (Guiraud, 2003).

II.4. Le type de fermentaire

La figure ci-dessous montre l'absence des bulles de gaz dans les cloche de Durham après l'incubation à 30°C pendant 24h ce qui révèle que cette souche *Lactococcus diacetylactis* est homofermentaire.

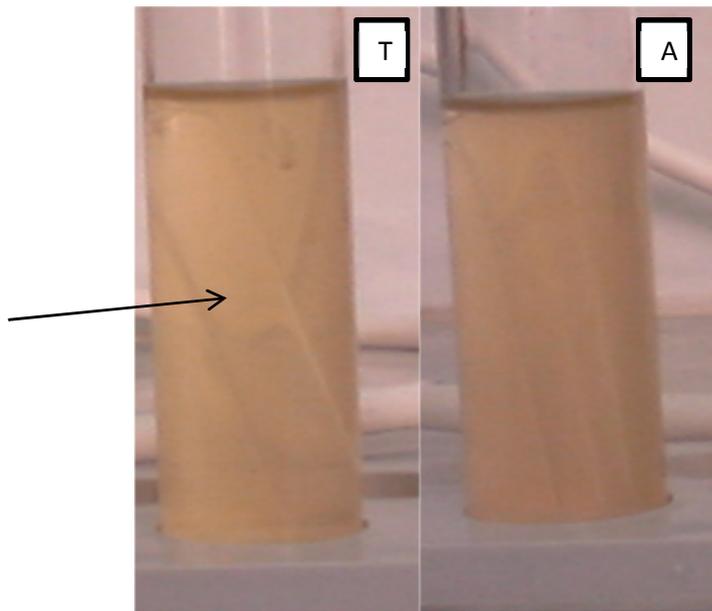


Figure 4: le type homofermentaire de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* par l'absence de gaz dans la cloche.

A : *Lactococcus diacetylactis* après l'incubation / T : témoin

II.5. Test de Sherman

La réduction de bleu de méthylène est observée par le virage de la couleur bleu du méthylène indiquant une activité microbienne intense de cette souche (**Hadef, 2012**).

Le bleu de méthylène tire sa couleur grâce à l'oxygène ,ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques , car vu que ce sont des microaérophiles , ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (0.3%) et de ce fait la couleur du lait(bleue) ne virera que légèrement ver le blanc et ce contrairement aux entérocoques (aérobies)qui utilisent tout l'oxygène du bleu de méthylène .les streptocoques fécaux se développent en présence de 0,1 de bleu de méthylène, La photo 5 représente les résultats (**Gomri,2013**).

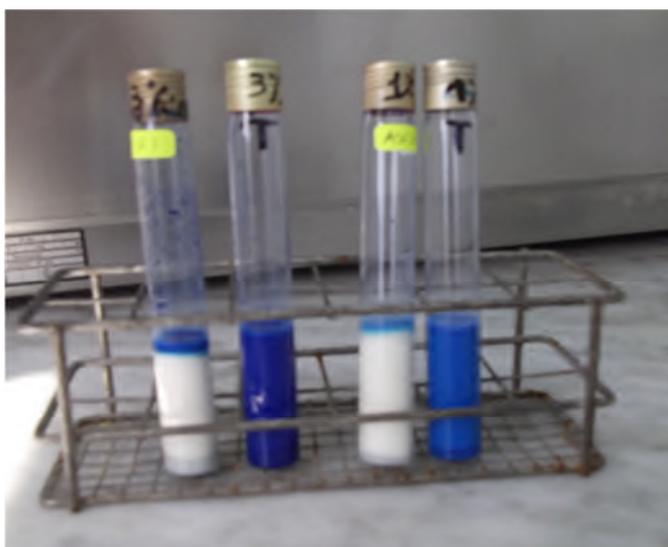


Photo 5 : Résultat de test de Sherman à 1% et 3%

II.6. Résultats des analyses produites finis

II.6.1. Analyses bactériologiques

Les résultats obtenus des analyses bactériologiques des trois types de fromages sont mentionnés dans le tableau 5 comparés aux normes Algériennes de fromage frais selon le Journal Officiel de la République Algériennes N° 35 du 27 mai 1998 (voir le tableau 6).

Le tableau 5 représente les résultats des analyses bactériologiques du différent fromage à partir de lait de vache.

Tableau 5 : les résultats bactériologiques du différent fromage frais

Flore	Nombre moyen des bactéries		
	I	II	III
<i>Coliformes totaux</i>	190	121	81
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence	Absence
<i>Streptocoque D</i>	Absence	Absence	Absence

* : (I : témoin ; II : lait + *lactococcus diacetylactis* ; III : lait + biofilm)

Tableau 6 : Les normes algériennes des fromages frais (J.O.R.A).

Flore	n	C	M	MS	ML
Coliforme totaux	5	2	10	10 ²	3×10 ²
Staphylococcus aureus	5	2	10	10 ²	3×10 ²
Streptocoque	absence	absence	Absence	absence	Absence

n : nombre d'unités composant l'échantillon. / c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre " m "et "M". / m : seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante
M : seuil limite d'acceptabilité.

-Les coliformes totaux

Selon les résultats obtenus on constate que sur les trois échantillons à analyser échantillon se situent entre le critère m et le seuil M, les produit sont considéré comme des produits acceptable 2/5. Par rapport à la norme de l'article 4 des spécifications microbiologiques (JOR N°35 du 27 mai 1998).

-Les staphylococcus aureus et les streptocoques

La recherche de la flore pathogène (*Staphylococcus aureus*, *Streptocoque*) dans le fromage frais élaboré s'est avérée négative dans tous les échantillons (Tableau 5). **D'après Hamama et al., 1995** dit que L'absence de ces germes dans ces produits est la conséquence de l'utilisation de matières premières de bonne qualité microbiologique et du respect des règles de l'hygiène durant les opérations de préparation du fromage.

L'absence des *staphylococcus aureus* dans le fromage au lait cru pasteurisé, indique que la pasteurisation détruit ces germes

II.6.2. Quelque analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques du différent fromage préparés à partir de lait de vache cru pasteurisé sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7: les résultats des analyses physico-chimiques du différent fromage préparés.

Type de fromage	I	II	III
Les analyses			
Dosage de pH	4,57	4,71	4,79
L'acidité titrable (°D)	16°D	10°D	13°D

* : (I : témoin ; II : lait + *lactococcus diacetylactis* ; III : lait + biofilm)

Le pH moyen des trois échantillons analysés est de l'ordre de 4.69, les moyennes des échantillons fabriqués au laboratoire sont respectivement 4,71 pour le fromage préparé à partir de la bactérie lactique seulement et 4.79 pour le fromage par le biofilm et 4,57 pour le témoin.

Selon **Hamama et al., 1995**, Le pH moyen de fromage frais est situé entre 4,5 et 5.

Les fromages analysés sont caractérisés par une acidité titrable élevée et un pH faible ce qui témoigne de la présence d'une fermentation lactique active.

II.3.3. Analyses sensorielles

Tableau 8 : évaluation sensorielle du fromage frais préparé

* Fromage		I	II	III	
Caractère étudié					
Couleur	Jaunâtre		30%	10%	
	Jaunâtre crème	40%	20%	20%	
	Crème claire	60%	30%		
	Blanchâtre		20%	70%	
Aspect	Sec	50 %	30%		
	Mouillé	20%	10%		
	Hydraté	30%	50%	100%	
	Collant		10%		
Texture	Ferme				
	Granulée	80%	60%	20%	
	Souple		30%	80%	
	Elastique	20%	10%		
	Onctueuse		0%		
Gout	Bon	30%	0%	50%	
	Moyen	40%	10%	10%	
	mauvais	Acide	20%	90%	10%
		Amère	10%		
		Rance			
		Salé			
Odeur	Lait				
	Beurre	30%	40%	40%	
	Fromage	40%		30%	
	Lben	30%	60%	30%	
Le fromage est		Moyen	Mauvais	Bon	

* : (I : témoin ; II : lait + *Lactococcus diacetylactis* ; III : lait + biofilm)

Cette analyse montre que les trois type de fromages ont marqué des différentes significatives, la majorité des dégustateurs estiment que le fromage préparés au lait de vache cru pasteurisé avec le biofilm est de bon qualité sensorielle par rapport au fromage préparer par l'utilisation de *lactococcus diacetylactis* à de mauvais qualité, et de moyen qualité pour le témoin.

Selon **Laithier et al., 2009**, L'analyse du profil de texture permet d'accéder à des grandeurs discriminantes corrélées à l'analyse sensorielle. La conduite de l'acidification semble être le premier facteur relié à l'apparition du caractère granuleux.

II.3.4. Résultat et discussion du rendement fromager

Le rendement fromager du fromage au lait cru pasteurisé avec le biofilm est 20.2 %, donc élevé par rapport au rendement du fromage au lait cru pasteurisé avec les bactéries lactiques (*lactococcus diacetylactis*) 16,9 % et au rendement du fromage au lait cru pasteuriser seul 15,2 %. **SelonYann, 2003**, la technologie d'utilisation des biofilms, permet d'augmenter la productivité du produit finis.

Conclusion

Conclusion

Cette étude, s'inscrit dans le cadre général de la coagulation du lait cru pasteurisé pour produire du fromage frais traditionnel. Dans une étuve à 28 °C et durant 24 heures, nous avons obtenus trois fromages après une fermentation naturelle (témoin), avec ajout des bactéries lactiques (*Lactococcus diacetylactis*) et avec ajout d'un biofilm (les *Lactococcus diacetylactis* fixés sur des particules argileuses).

Après une comparaison entre nos résultats sur les rendements et les qualités organoleptiques et bactériologiques des fromages obtenus, nous avons pu faire les remarques suivantes :

- ❖ Le biofilm permet d'obtenir un bon fromage avec 20,2 % de rendement et des qualités organoleptiques suivantes :(Couleur blanchâtre, Aspect hydraté, Texture souple, Bon gout, Odeur de beurre).
- ❖ La bactérie (*Lactococcus diacetylactis*) permet d'obtenir une mauvaise qualité du fromage avec 16,9% de rendement et avec de qualité organolyptique (Couleur jaunâtre, Aspect hydraté,Texture granulée ,mauvaise gout , odeur de beurre).
- ❖ Le témoin permet d'obtenir une qualité moyenne du fromage avec 15,2% de rendement et des qualités organolyptiques (Couleur Crème claire, Aspect Sec, Texture granulé, gout moyen, odeur de fromage).

Les trois types des fromages sont considérés comme des produits acceptables dans le cadre de la qualité bactériologique selon le journal officiel algérienne.

En conclusion, on peut dire que l'utilisation d'un biofilm dans la coagulation du lait, est bon moyen pour augmenter d'une part le rendement du fromage et d'autre part améliorer ses caractéristiques organoleptiques. Cependant et en perspective, ce travail reste une première ébauche et incomplet, il doit être poursuivi par une étude plus approfondie pour pouvoir tirer des conclusions définitives.

Fin les résultats obtenus dans cette étude prouvent la grande importance de l'utilisation d'un biofilm dans la coagulation du lait donne une bonne qualité microbiologique dans la fabrication du fromage traditionnel. De plus, l'immobilisation cellulaire limite les risques de contamination.

Références

Bibliographiques

Référence bibliographique

Ababsa, A. (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas- Setif.p 11.

Abiazar, R. (2007). Complexation des protéines lactières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Thèse de doctorat. p 24.

Aleksandra P, D.V. Ljiljana V, M. Bojan M, J. Svetlana B, N. Jelena D, P. (2013). Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Contents lists et sciVerse Science Direct. Bioresource Technology*, **135** ; 454-458.

Assassi, F. (2010). Synthèses et caractérisations des nano composites poly pyrrole/montmorillonite organomodifiée a stabilité thermique améliorée. Mémoire de magister, Université d'Oran. p 3.

Balla, A. (2010). Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin. Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah Ouargla. p 23.

Belhadi, N. (2009). Effets des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait de vache en régions Montagneuses. Mémoire de magister, Université de Tizi-Ouzou .p 8.

Boublenza, F. (2012). Etude du stress osmotique chez des *lactocoque* isolés de lait de chamelle de Timimoun. Thèse de doctorat, Université d'Oran. p 35.

Bougdah, N. (2007). Etude de l'adsorption de micropolluants organiques sur la bentonite. Mémoire de magister, Université de Skikda. p 32.

Charles, A. Cuy, L. et Larpent, M. du zinc sur la bentonite de Maghnia. Mémoire de master académique, Université Kasdi Merbah Ouargla. Pp 5-6.

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(1)** ; 143-154.

Drouault, S .et Corthier, G. 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la sante.Article de synthèse *.INRA EDP Sciences. Vet. Res.* 32-101-117.

Garry, P. (1999).Les bactérie lactiques. *Bull. liaison CTSCCV* vol. 9, N°6 ; 423-430

Ghazi, K. et Niar, A. (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *TROPICULTURA*, **29** ; 193-196.

Référence bibliographique

- Gomri, A. (2013).** Diversité et propriété fonctionnelles des bactéries lactiques isolées des margines d'olives fermentés. Mémoire de magister, Université d'Oran. P 47.
- Hadef, S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah-Ouargla. Pp 03-28-29.
- Hamama, A. Zahar, M. EL Marrakchi, A. Aboulala, F. Bent Mohamed Abderrahman, M. (1995).** Préparation du fromage frais à partir du lait recombinaison. *Actes Inst. Agron. Veto (Maroc)*, Vol. 15 (4) : 21-26.
- Husson, G.P. Lecso, M. Hui, F. L'edion, J. (2010).** Étude des charges inorganique et bactériologique de biofilms formés en eau potable. *Cahiers de l'ASEES* ; 1-15.
- Ilboudo, A.J. Savadogo, A. Seydi, M.G. et Traore A.S. (2012).** Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **6(6)** ; 6075-6087.
- Ibrahim, M. Briandet, R. Mistou, M. Chrétien, A. Tremblay, J. et Kulakauskas, S. (2004).** Immobilisation des *lactocoques*. INRA, EDP Sciences ; 103-114.
- Jean, P. et Larpent. (1997).** Microbiologie alimentaire. Technique de laboratoire. Paris.p 1073.
- Joffin, J.N. et Leyral, G. (2006).** Microbiologie Technique Tom 1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition, aquitaine. Pp 33-370.
- Larpen, J.P. (1997).** « Microbiologie alimentaire », édition : *tec et doc*. ISBN : 2-7430-0155-0, France .P 530.
- Laithier, C. Chatelin, M. Barrucand, P. Duchesne, C. Morge, S. Barral, J. Cuveiller, D. et Minard, L. Leroux, V. (2009).** Evaluation et maîtrise de la texture des fromages frais de chèvre à coagulation lactique. *Renc. Rech. Ruminants*, **16** ; 143-146.
- Mansour, S. (2009).** Etude de la levure *Yarrowia lipolytica* dans un écosystème fromager par une approche transcriptomique. Thèse de doctorat, L'institut des sciences et industrie du vivant de l'environnement (Agro Paris Tech).P 1.
- Marchal, N. Bourdon, J. et Richard, CL. (1987).** Les milieux de culture, pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3^{ème} Edition. Paris. P 505.
- Meziane, M. (2007).** Production en continu de l'acide lactique et du diacétyl par *Lactococcus lactis* ssp immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe. Mémoire de magister, Université Hassiba ben bouali Chlef.p 52.

Référence bibliographique

Moulay, M. (2005). Etude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée. Mémoire de magister. p 61,78.

Moulay, M. Aggad, H. Benmechernene, Z. Guessas, B. Henni, D.E. et Kihal, M. (2006). Cultivable lactic Acide Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. World Journal of Dairy & Food Sciences 1. *IDOSI Publications* ; 12-18.

Novel, G. 1993. Les bactéries lactiques in microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel, Eds J. Y. Leveau et M. Boix ; tec et doc-Lavoisier, paris. France. P.194.

Parot, S. (2007). Biofilms électro actifs Formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat, l'institut National Polytechnique de Toulouse. p 10.

Raynaud, S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnel de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de doctorat, l'institut National des sciences applique de Toulouse. p 21.

Robert W., Hutkins, 2006. Micobiology and Technology of fermented foods. *IFT press* et Blackwell publishing. Pp 20-25.

Romain, J. Thomas, C. Pierre, S. et Gérard, B. (2007). Science des aliments technologie des produits alimentaires. Edition Paris vol 2. p 456.

Sanders J.W., Gerard Venema, Jankok., 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis* .*FEMS microbiology Reviews* **23** ; 483-501.

Souid, W. (2010). Effet des bactériocines (type nisine) produites par une souche lactique isolée à partir du fromage cameline, sur une souche psychrophe. Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah-Ouargla. P20.

Yahiaoui, N. (2012). Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif. Mémoire de magister, Université de Tizi-Ouzou .p 41.

Yann, D. (2003). Production en continu de ferments lactique probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval Québec. p 4,13.

Zarour, K. Benmechernene, Z. Hadadji, M. Moussa, B.B. Henni, J.E. et Kihal, M. (2012). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc*

Référence bibliographique

mesenteroïdes isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 08 ; 39-47.

Annexes

Annexes 01

MRS (bouillon) : sa formule en gramme par litre d'eau distillée.

Peptone.....	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80 (=polysorbate 80).....	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique.....	2g
Sulfate de magnésium	220mg
Sulfate de manganése.....	50mg

pH=6,5 .Autoclavage 15 minutes à 120°C

Annexes 02

Milieu M17(Le bouillon) : a été mis au point pour la culture et dénombrement des lactocoques dans le lait et les produits laitiers. Il favorise la culture des mutants incapables de fermenter le lactose. Il est bien adapté à la culture de l'espèce *Lactococcus lactis* qui est un microorganisme particulièrement exigeant.

Tryptone	5g
Peptone de soja	5g
Infusion de viande	5g
Extrait de levure	2,5g
B glycérophosphate de sodium	19g
Lactose	25g
Acide ascorbique	0,5g
Sulfate de magnésium	0,25g
(Agar	11 g pour une gélose)

pH=6,9

Annexe 03

Coloration de Gram

But : Permet de distinguer les bactéries Gram + et Gram – en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

Principe : Basé sur la composition chimique de la paroi des bactéries. Le Gram différencie les bactéries selon qu'elles aient conservé le cristal violet après le traitement à l'alcool ou non.

Préparation du frottis :

À partir d'un bouillon : Mettre 2 gouttes de suspension bactérienne préalablement émulsionnée au centre d'une lame. Étaler en couche mince au centre de la lame. Faire sécher complètement sur bec bensen et fixer à la flamme 3 fois.

À partir d'une gélose : Mettre une goutte d'eau distillée à l'aide d'un fil bouclé au centre d'une lame. Avec un fil droit prendre une petite partie d'une colonie isolée, la déposer à côté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau. Faire sécher complètement sur plaque chauffante et fixer à la flamme 3 fois (**Meziane, 2007**).

Technique de coloration

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 30 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
5. Recouvrir la préparation de fuschine, laisser agir environ 1 min. lavé abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Annexe 04**Lait écrémé**

Utilisé pour les cultures bactériennes, et la conservation des souches. Composition en g/l
(Moulay, 2005).

Repartir en 10ml par tube puis l'autoclavé 10 min à 100°C

Les ingrédients	Composition
Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0,5g
Eau distillée	100ml
Ph	6,8

Annexe 05

Milieu de Rothe : sa formule en gramme par litre d'eau distillée (Marchal et *al.*, 1987)

Hydrolysate tryptique de caséine	12,6
Peptone bactériologique	8
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique.....	2,7
Phosphate mono potassique.....	2,7
Acide de sodium	0,2

Ph final : 6,8±0,2

Dissoudre 36,2g de milieu sec par litre d'eau distillée si l'on désire préparer un bouillon à concentration normale (doubler la dose, soit 72,4g/l si l'on désire un bouillon à double concentration).

Répartir et stériliser à l'autoclave à 118°C pendant 15min.

Annexe 06



Lait



Lait+Lc



Lait+Biofilm

Photo 01 : coagulation de lait



Photo 02 : Décaillage du coagulum



Photo 03 : Égouttage du coagulum.



Photo 04 : Saumurage de caillé



Photo 05 : démoulage de fromage

Annexes 07**Le poids de la pâte et le volume de lactosérum évacué**

Dans le tableau 1 sont indiqués les poids de la pâte et les volumes du lactosérum de chaque type de fromage préparé.

Tableau1 : Poids de la pâte et les volumes du lactosérum de chaque type de fromage préparé.

Type* de fromage	I	II	III
Paramètres			
Poids de la pâte (g)	76	84,34	101,22
Volume de lactosérum (ml)	350	300	200

* : (I : témoin ; II : lait + *lactococcus diacetylactis* ; III : lait + biofilm)

Résumé

Les travaux réalisés dans ce mémoire ont pour objectif d'étudier la possibilité d'utilisation de la bactérie lactique (*Lactococcus diacetylactis*) et bentonite de Maghnia pour le but de formation d'un biofilm, dans ce cadre de l'étude l'effet de biofilm sur le temps de coagulation de lait, le rendement de fromage et leur qualité.

Le rendement fromager du fromage au lait cru pasteuriser avec biofilm est 20.2%, donc élevé par rapport du fromage au lait cru pasteuriser avec la bactérie lactique (*Lactococcus diacetylactis*) 16,9% et au rendement du fromage au lait cru pasteuriser seul 15,2%. Dans ce cas la technologie d'utilisation des biofilms, permet d'augmenter la productivité du produit fini.

L'adoption de cette procédure de préparation à donner lieu à des produits de qualité organoleptique bon pour le fromage produit par l'utilisation des biofilm par rapport les fromages à partir du *Lactococcus diacetylactis* est mauvais et pour le témoin est de moyen qualité et a une qualité microbiologique acceptable pour les trois types des fromages.

Mots clé : *Lactococcus diacetylactis*, bentonite de Maghnia, biofilm, lait de vache cru pasteurisé, fromage traditionnel.

المخلص

الأعمال المنجزة في هذه الأطروحة بهدف إمكانية استعمال الطين و البكتيريا من أجل تخثر الحليب النيء المبستر لغرض تحضير الجبن التقليدي. المعقد مشكل من بنتونيت مغنية و بكتيريا *Lactococcus diacetylactis* التي لديها إمكانية الالتصاق الجيد. التجارب أجريت من أجل دراسة تأثير المعقد على زمن تخثر الحليب المرود و نوعية الجبن التقليدي المحضر. مرود الجبن الطري المصنوع بواسطة المعقد يقدر بقيمة 20,2% وهذا يعني أنه ذو نسبة عالية بالنسبة للجبن المصنوع بواسطة البكتيريا و الحليب 16,9% و الحليب النيء المبستر 15,2%. لهذا نستخلص أن استعمال المعقد يسمح لنا برفع الانتاجية, بالإضافة إلى أنه يؤدي إلى إعداد منتج ذو جودة عالية و سيء بالنسبة للجبن المصنوع بالبكتيريا و الحليب و متوسط بالنسبة للحليب فقط. إن الاعتماد على هذه الطريقة مكننا من تحضير جبن تقليدي ذو نوعية بكتريولوجية مقبولة بالنسبة للأنواع الثلاثة للجبن.

الكلمات المفتاحية

Lactococcus diacetylactis, بنتونيت مغنية, biofilm, حليب نيء مبستر, جبن تقليدي