

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM ALGERIE

FACULTE SNV/STU



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire,  
au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)



بر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية البيوطب والبيئة

THESE

Présentée par

Mme **BENDIMERAD NAHIDA**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT**

En Microbiologie, spécialité : Microbiologie alimentaire

Intitulée

**Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben.»**

Soutenue publiquement en avril 2013 devant le jury constitué de :

<b>Président</b>	Pr Abdelouahed Djamel Eddine	Université de Tlemcen
<b>Examineurs</b>	Pr Guessas Battache	Université d'Oran
	Dr Hassaine Hafida (MCA)	Université de Tlemcen
	Dr Beuvier Eric	INRA.URTAL. Poligny.France
<b>Promoteur</b>	Pr Kihal Mebrouk	Université d'Oran
<b>Co-promoteur</b>	Dr Berthier Françoise	INRA.URTAL. Poligny.France

Année Universitaire 2012-2013



# *Dédicaces*

*A toute ma famille  
et belle famille  
surtout mon adorable petit fils  
« Abderrahim »*





# Remerciements

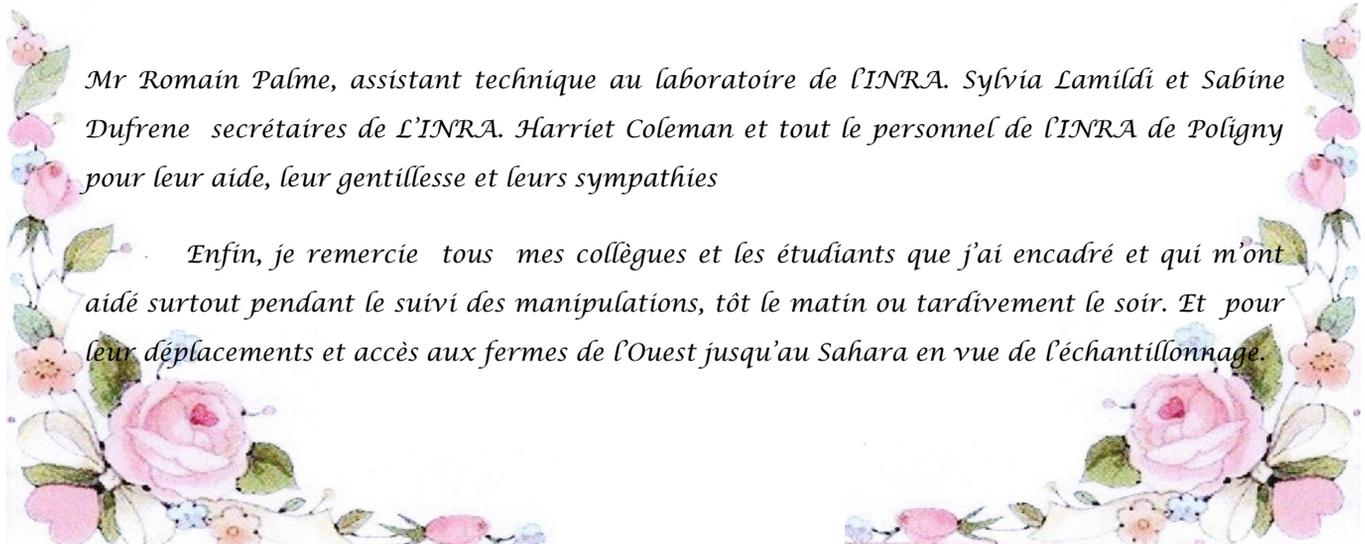
*Je tiens à remercier mon directeur de thèse le professeur Mebrouk Kihal d'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie aussi pour le choix du sujet intéressant et d'actualité. Pour son aide, ses conseils, et ses orientations. Pour sa disponibilité et sa patience avec moi.*

*Mes vifs remerciements sont adressés à mon Co-promoteur, le docteur Françoise Berthier d'avoir accepté de m'accueillir la première fois à l'INRA de Poligny et chaque fois que je décide de faire un stage. D'avoir accepter aussi d'être mon co-encadreur. Je ne cesserai de la remercier aussi, pour son aide, ses conseils, et ses orientations. Pour sa disponibilité, sa patience et son hospitalité. Merci encore une fois madame.*

*Je remercie aussi le professeur Djamel Eddine Abdelouahed d'avoir accepté de présider ce travail. Le professeur Bettache Gessas et le Docteur Hafida Hassaine d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes vifs remerciements sont adressés aussi au Docteur Eric Beuvier, directeur de l'INRA, pour ses accueils à Poligny. Je le remercie aussi pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie également, toutes les personnes en France et en Algérie qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, surtout le professeur Moussa Boudjemaa, directeur du laboratoire de microbiologie LAMMABE. Le professeur Belarbi Meriem vice doyenne de la post graduation de la faculté SNV/STU et chef d'équipe du laboratoire « substances naturelles » et Mr Bouayed Kamel ex responsable du laboratoire Giplait de Tlemcen (ex OROLAIT)*



*Mr Romain Palme, assistant technique au laboratoire de l'INRA. Sylvia Lamildi et Sabine Dufrene secrétaires de L'INRA. Harriet Coleman et tout le personnel de l'INRA de Poligny pour leur aide, leur gentillesse et leurs sympathies*

*Enfin, je remercie tous mes collègues et les étudiants que j'ai encadré et qui m'ont aidé surtout pendant le suivi des manipulations, tôt le matin ou tardivement le soir. Et pour leur déplacements et accès aux fermes de l'Ouest jusqu'au Sahara en vue de l'échantillonnage.*

## TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
RESUME.....	
INTRODUCTION.....	1
Partie 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
Chapitre I : Le lait.....	4
I.1 Définition.....	4
I-2 Caractéristiques générales.....	4
I-3 Situation de l'Afrique dans la production mondiale de lait.....	5
I-4 Production et consommation de lait en Algérie.....	8
I-5 Caractéristiques du lait selon les espèces.....	12
I-5 1. Lait de vache.....	13
I-5 2. Lait de brebis.....	13
I-5 3. Lait de chèvre.....	15
Caractéristiques physiques et (bio) chimiques.....	15
Caractéristiques nutritionnelles/santé.....	16
I-5 4. Lait de Jument.....	17
Caractéristiques physiques et (bio)chimiques.....	17
Caractéristiques nutritionnelles/santé.....	17
I-5 5. Lait de chamelle à une bosse.....	18
Caractéristiques physiques et (bio) chimiques.....	18
Caractéristiques nutritionnelles/santé.....	19
Chapitre II : BACTERIES LACTIQUES (LAB).....	24
II.1 Définition.....	24
II.2 Caractéristiques d'intérêt technologique pour les produits laitiers.....	24
Production d'acides organiques en grande quantité.....	24
Protéolyse.....	31
Production de composés liés aux caractéristiques sensorielles.....	32
II.3 Taxonomie.....	36
II.4 Genre <i>Leuconostoc</i> .....	37
Habitat et rôle.....	37
Caractéristiques physiologiques et métaboliques.....	38
Taxonomie.....	42
Isolement et identification des <i>leuconostocs</i> laitiers.....	42
II.5 Genre <i>Lactococcus</i> .....	47
Morphologie.....	47
Habitat et rôle.....	48
Caractéristiques physiologiques et métaboliques.....	50
Taxonomie.....	54
Isolement et identification.....	57
II.6 Genre <i>Enterococcus</i> .....	60
Morphologie.....	60
Habitat et rôle.....	60
Pouvoir pathogène.....	60
Physiologie et métabolisme.....	61
Taxonomie.....	63
Identification.....	64
III PRODUITS LAITIERS.....	67
III-1 Définition.....	67
III-2 Historique.....	67
III-3 Technologie fromagère.....	68
Coagulation ou caillage.....	68

Première voie : coagulation par voie acide.....	68
Deuxième voie: coagulation par voie enzymatique.....	68
Egouttage.....	69
Salage.....	70
Affinage.....	70
III-4 Ecosystèmes des produits laitiers.....	70
III-5 Classification des fromages.....	71
III-6 Produits laitiers algériens.....	73
Rayeb.....	74
L'ben.....	75
Klila.....	75
Zebda et Smen.....	76
Jben.....	76
Bouhezza.....	77
Kemaria, Takemarit.....	77
Ibakhbakhane.....	78
Imadhghass.....	78
Adhghass.....	78
Aghoughlou.....	78
MATERIELS ET METHODES.....	79
I ECHANTILLONNAGE DES LAITS.....	79
II ISOLEMENT DES LAB MESOPHILES.....	79
III EXTRACTION DE L'ADN.....	80
IV IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ISOLATS PAR PCR.....	80
IV-1 Rep PCR.....	80
Principe.....	80
Mode opératoire.....	80
Interprétation.....	82
IV-2 PCR spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une sous-espèce.....	82
Principe.....	82
Mode opératoire commun.....	83
PCR spécifique du genre <i>Enterococcus</i> .....	83
PCR spécifique de l'espèce <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	85
PCR spécifique des sous espèces <i>lactis</i> et <i>cremoris</i> de <i>L. lactis</i> .....	85
V- CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS.....	85
V.1 Caractères morphologiques.....	85
V.2 Caractères physiologiques.....	86
Croissance à différentes températures.....	86
Croissance sur milieu salé.....	86
V.3 Caractères biochimiques.....	86
Test de la catalase.....	86
Type fermentaire.....	86
Voie des acides mixtes.....	86
Utilisation du citrate.....	87

Hydrolyse de l'arginine.....	87
Recherche de protéase.....	87
Production de dextrane.....	87
Production d'acétoine.....	87
Production d'indole.....	88
Utilisation des sucres.....	88
V-4 Capacité à acidifier le lait.....	88
Préparation des laits.....	88
Mesure de l'acidité.....	89
Capacité à coaguler le lait en 18 H.....	89
Suivi de l'évolution du pH et des quantités d'acide produites en fonction du temps à 30°C.....	89
Variation des valeurs de pH en fonction de la température d'incubation.....	90
VI ESSAI DE FABRICATION DE FROMAGES TYPE Jben.....	90
VI-1 Préparation des levains.....	90
VI-2 Fabrication proprement dite.....	91
VII- ANALYSE DES FROMAGES.....	91
VII-1 Analyses microbiologiques.....	91
VII-2 Analyses physico-chimiques.....	92
Détermination du poids.....	92
Mesure de la température.....	92
Acidité titrable.....	92
Détermination de l'extrait sec total et de l'humidité.....	92
Détermination de la teneur en matière grasse et du gras/sec.....	93
VII-3-Evaluation sensorielle.....	93
Objectif.....	93
Epreuve triangulaire.....	94
Test de classement.....	94
RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	96
I-ISOLATS LACTIQUES.....	96
I-1 Sources des isolats.....	96
I-2 Identification moléculaire des isolats.....	98
Diversité génotypique au sein des espèces et sous espèces.....	101
I-3- Caractérisation des isolats.....	104
I-3-1 Phénotypes des isolats de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	104
Phénotypes utilisés pour l'identification.....	104
Capacité acidifiante.....	104
Capacité coagulante rapide.....	104
Effet de la température sur la capacité acidifiante (figure 39).....	104
Effet de l'extrait de levure sur la capacité acidifiante à 30 °C.....	105
Evolution du pH en fonction de l'acide produit.....	110
I-3-2. Phénotypes des isolats <i>Lactococcus lactis</i> .....	111
Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique.....	111
Capacité acidifiante.....	111

<i>Capacité coagulante rapide</i> .....	<b>111</b>
<i>Effet de l'extrait de levure sur l'acidification</i> .....	<b>112</b>
<i>Effet de la température sur l'acidification (figure 39)</i> .....	<b>112</b>
<i>Evolution du pH en fonction de l'acide produit</i> .....	<b>114</b>
<i>I-3-3 Phénotypes des isolats d'entérocoques</i> .....	<b>115</b>
<i>Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique</i> .....	<b>115</b>
<i>Capacité acidifiante</i> .....	<b>115</b>
<i>Capacité coagulante rapide</i> .....	<b>115</b>
<i>Effet de l'extrait de levure sur la capacité acidifiante</i> .....	<b>117</b>
<i>Effet de la température sur la capacité acidifiante</i> .....	<b>120</b>
<i>Evolution du pH en fonction de l'acide produit</i> .....	<b>120</b>
<i>I-3-4-Phénotypes des isolats de lactobacilles</i> .....	<b>126</b>
<i>Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique des isolats</i> .....	<b>126</b>
<i>Capacité acidifiante</i> .....	<b>126</b>
<i>Capacité de coagulation rapide</i> .....	<b>126</b>
<i>Effet de l'extrait de levure sur la variation du pH en fonction du temps</i> .....	<b>126</b>
<i>Evolution du pH en fonction de l'acide</i> .....	<b>127</b>
<i>II-ESSAI DE FABRICATION D'UN FROMAGE TYPE « JBEN »</i> .....	<b>127</b>
<i>II.1-Fabrication des fromages</i> .....	<b>127</b>
<i>II-2- Tests d'acidité</i> .....	<b>130</b>
<i>II-3- Analyses microbiologiques</i> .....	<b>133</b>
<i>II-4-Epreuve sensorielle</i> .....	<b>134</b>
<i>DISCUSSION</i> .....	<b>136</b>
<i>CONCLUSION</i> .....	<b>147</b>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....	<b>150</b>
<i>ANNEXES</i> .....	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Teneur en vitamines de différents types de lait (par litre) <a href="http://www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F0c.htm">http://www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F0c.htm</a> .....	5
<b>Tableau 2</b> : Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (en g/l) <a href="http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm">http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm</a> .....	13
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques physiques (valeurs moyennes) des laits de quatre espèces de mammifères <a href="http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm">http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm</a> .....	20
<b>Tableau 4</b> : Composition moyenne en g/litres et distribution des protéines dans le lait de quatre espèces de mammifères <a href="http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm">http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm</a> .....	21
<b>Tableau 5</b> : Teneurs en minéraux en (g/litre) des laits de cinq espèces de mammifères <a href="http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm">http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm</a> .....	22
<b>Tableau 6</b> : Teneurs en vitamines (mg/litre) des laits de cinq espèces de mammifères <a href="http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm">http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm</a> .....	23
<b>Tableau 7</b> : Nom et nature chimique des principaux composés d'arômes principaux dérivés de la méthionine, des acides aminés à chaîne ramifiée et des acides aminés aromatiques (Curtin et McSweeney, 2004).....	34
<b>Tableau 8</b> : Aliments fermentés qui peuvent contenir les leuconostocs (Hemme et Foucaud -Scheunemann, 2004) .....	37
<b>Tableau 9</b> : Principaux phénotypes différenciant le genre <i>Leuconostoc</i> d'autres bactéries lactiques (Bergey's Manual, 2009).....	43
<b>Tableau 10</b> : Caractères phénotypiques différenciant les espèces de leuconostocs (Bergey's Manual, 2009). Entre temps, <i>L. paramesenteroides</i> a été reclassifié et n'est plus un leuconostoc.....	44
<b>Tableau 11</b> : Caractères phénotypiques différenciant certaines espèces de leuconostocs (Farrow et al., 1989).....	46
<b>Tableau 12</b> : Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des exploitations agricoles (Teuber et Geis, 2006).....	48
<b>Tableau 13</b> : Lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers (Teuber et Geis, 2006).....	49
<b>Tableau 14</b> : Caractéristiques des souches de la sous-espèce <i>tructae</i> et d'autres taxons du genre <i>Lactococcus</i> (Perez et al. 2011). 1, 2, 3 : <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Tructae</i> .....	56

<b>Tableau 15</b> : Différences phénotypiques entre <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> . (Teuber et al., 1995).....	<b>57</b>
<b>Tableau 16</b> : Caractéristiques phénotypiques des 20 souches sauvages de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et subsp. <i>cremoris</i> isolées de laits crus et de fromages fabriqués sans levains (Fernandez et al., 2011).....	<b>58</b>
<b>Tableau 17</b> : Analyse par PCR et RFLP du gène <i>gadB</i> chez <i>Lc. lactis</i> (Nomura, 2002).....	<b>59</b>
<b>Tableau 18</b> : Physico-chimie de quelques produits laitiers algériens (Lahsaoui, 2009).....	<b>75</b>
<b>Tableau 19</b> : Sources des isolats (1/3).....	<b>96</b>
<b>Tableau 20</b> : Fréquence et identité des coques mésophiles isolés des différents laits crus et fermentés.....	<b>102</b>
<b>Tableau 21</b> : Acide produit par les isolats <i>Leuconostoc</i> à coagulation rapide après 18h de culture en lait à 30°C.....	<b>104</b>
<b>Tableau 22</b> : Acide produit par les isolats de lactocoques à coagulation rapide après 18 heures de culture en lait 'Régilait' à 30 °C (en °D).....	<b>111</b>
<b>Tableau 23</b> : Acide produit par les isolats d'entérocoques à coagulation rapide après 18 heures de culture en lait à 30 °C (en mM).....	<b>116</b>
<b>Tableau 24</b> : Analyses physico-chimiques des fromages S et I à 2 jours .....	<b>129</b>
<b>Tableau 25</b> : Analyses microbiologiques des caillés S et C à 24 h heures de fabrication. Nombres de germes en ufc/g.....	<b>133</b>
<b>Tableau 26</b> : Epreuve triangulaire appliquée pour l'aspect externe des fromages.....	<b>134</b>
<b>Tableau 27</b> : Epreuve triangulaire appliquée pour le goût des fromages.....	<b>134</b>
<b>Tableau 28</b> : Epreuve de classement des trois fromages S,.....	<b>135</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Variation géographique de la production de lait en 2010 (FIL, 2011).....	6
<b>Figure 2</b> : Variation géographique de la production de lait selon le nombre d'habitant en 2010 (FIL, 2011).....	6
<b>Figure 3</b> : Variation géographique de l'augmentation de la production laitière entre 2005 et 2010 (FIL, 2011) .....	7
<b>Figure 4</b> : Déficit laitier prévisionnel jusqu'en 2050 pour les quatre grandes régions géographiques mondiales déficitaires (FIL, 2011).....	7
<b>Figure 5</b> : Variation géographique de la consommation apparente de produits laitiers en 2010 (FIL, 2011).....	9
<b>Figure 6</b> : Principaux pays éleveurs de chameaux (FAO ,2006).....	12
<b>Figure 7</b> : métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques par la voie homofermentaire de la glycolyse (Fox et al., 2000).....	26
<b>Figure 8</b> : métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques par la voie hétérofermentaire des pentoses-phosphate (Fox et al., 2000).....	27
<b>Figure 9</b> : Voies homofermentaire/homolactique (glycolyse + LDH, rectangle gauche) et hétérofermentaire/hétérolactique (voie des pentoses-phosphate, fond gris) (Raynaud, 2006)....	28
<b>Figure 10</b> : Voie hétérofermentaire facultative des hexoses chez <i>Lactococcus lactis</i> (Raynaud, 2006).....	29
<b>Figure 11</b> : Voie schématisée de la conversion du pyruvate par <i>Lc. lactis</i> en condition aérobie à pH acide (Lopez de Felipe et Hugenholtz,1999).....	30
<b>Figure 12</b> : Métabolisme du pyruvate (Raynaud, 2006).....	30
<b>Figure 13</b> : Métabolisme du lactate dans le fromage en cours d'affinage (McSweeney et Fox, 2004).....	31
<b>Figure 14</b> : Métabolisme du citrate par les souches citrate-positive chez les lactocoques et les entérocoques (Mc Sweeney et Fox, 2004).....	33
<b>Figure 15</b> : Voies du catabolisme des acides aminés chez différents microorganismes et certaines réactions chimiques (lignes pointillées) survenant dans les fromages en cours d'affinage (Curtin et Mc Sweeney, 2004).....	35
<b>Figure16</b> : Taxonomie des bactéries lactiques (Ludwig et al., 2009), basée sur la comparaison des séquences d'ADN 16Rdna.....	36
<b>Figure 17</b> : Images de <i>Leuconostoc</i> .....	37
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique du flux de carbone et énergie dans les voies centrales du métabolisme de divers oses par <i>L. mesenteroides</i> (Dols et al. 1997).....	40
<b>Figure 19</b> : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Bourel et al. 2001).....	41
<b>Figure 20</b> : Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de leuconostocs selon leur séquence 16S rDNA (Chun and al, 2012).....	42

<b>Figure 21</b> : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chainette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006).....	<b>47</b>
<b>Figure 22</b> : Métabolisme du glucose, du lactose et du citrate par <i>Lc. lactis</i> en amont du pyruvate (Raynaud, 2006).....	<b>51</b>
<b>Figure 23</b> : Distribution des atomes de carbone dans les métabolites dérivés du pyruvate chez <i>Lc. lactis</i> (Hofnagel et al., 2002).....	<b>51</b>
<b>Figure 24</b> : Cycle du TCA et lutte contre l'acidification du cytoplasme (Raynaud, 2006).....	<b>52</b>
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique du mécanisme de réduction du lait par <i>Lc. lactis</i> (Tachon et al. 2009).....	<b>53</b>
<b>Figure 26</b> : Representation schématique du métabolisme de l'arginine chez <i>Lactococcus lactis</i> (Raynaud, 2006).....	<b>53</b>
<b>Figure 27</b> : Représentation schématique du système protéolytique et régulation de l'expression des gènes du régulon protéolytique de <i>Lc. lactis</i> (Raynaud, 2006).....	<b>55</b>
<b>Figure 28</b> : Position phylogénétique de la sous-espèce <i>tructae</i> au sein des espèces de lactocoques d'après les séquences codant le 16S rDNA (Pérez et al. 2011).....	<b>55</b>
<b>Figure 29</b> : Empreintes Rep-PCR avec amorce (GTG) <sub>5</sub> des sous-espèces de <i>Lc lactis</i> (Pérez et al., 2011).....	<b>59</b>
<b>Figure 30</b> : Arbre phylogénétique de 24 espèces d'entérocoques basé sur la séquence codant le 16S rDNA (Grazia et al. 2004).....	<b>64</b>
<b>Figure 31</b> : Profil protéique de souches d'entérocoque phylogénétiquement proches (Vancanneyt et al., 2001).....	<b>65</b>
<b>Figure 32</b> : Dendrogramme montrant le profil des souches d'entérocoques obtenu par amplification PCR avec l'amorce D11344 (Vancanneyt et al, 2001).....	<b>66</b>
<b>Figure 33</b> : Classification technologique des fromages en fonction des places respectives de l'égouttage et de l'acidification (Mietton et al., 2004).....	<b>72</b>
<b>Figure 34</b> : Variété de fromages frais (Tamine et al., 2011).....	<b>73</b>
<b>Figure 35</b> : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens (modifié d'après Lahsaoui, 2009).....	<b>74</b>
<b>Figure 36</b> : Amplification des ADN de <i>L. plantarum</i> et <i>L. paraplantarum</i> avec les paires d'apores 16/ <i>LpapI</i> (= <i>papI</i> ) et 16/ <i>Lpl</i> (= <i>plant</i> ) (Berthier et Ehrlich, 1998).....	<b>84</b>
<b>Figure 37</b> : Dendrogramme des profils Rep-PCR des 84 isolats et d'une sélection de LAB de référence (Bendimerad et al., 2012).....	<b>100</b>
<b>Figure 38</b> : Dendrogramme et profils Rep-PCR du groupe Rep A7 correspondant aux isolats et aux souches de référence <i>L. mesenteroides</i> (Bendimerad et al., 2012).....	<b>101</b>
<b>Figure 39</b> : Valeurs moyenne du pH de laits stériles (lait 'Sabourin')ensemencés par les isolats indiqués plus bas, après 48 h d'incubation, en fonction de la température d'incubation.....	<b>105</b>
<b>Figure 40</b> : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>L. mesenteroides subsp. inconnue</i> '29' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>107</b>

<b>Figure 41:</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> '64' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>107</b>
<b>Figure 42 :</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> '109' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>108</b>
<b>Figure 43:</b> Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>inconnue</i> (un seul génotype Rep );.....	<b>108</b>
<b>Figure 44 :</b> Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i> .....	<b>109</b>
<b>Figure 45 :</b> Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> (un seul génotype Rep).....	<b>109</b>
<b>Figure 46:</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> '96' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>113</b>
<b>Figure 47 :</b> Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> .....	<b>114</b>
<b>Figure 48:</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>E. durans</i> '22' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>118</b>
<b>Figure 49 :</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>E. hirae</i> de génotype 1 '99' à 30 °C pendant 24h.....	<b>118</b>
<b>Figure 50 :</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat de l'isolat <i>E. hirae</i> de génotype 2 '39' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>119</b>
<b>Figure 51:</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat de l'isolat <i>E. sp.</i> '27' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>119</b>
<b>Figure 52 :</b> Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>E. faecalis</i> '68' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>120</b>
<b>Figure 53 :</b> Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>E. durans</i> de génotype 1.....	<b>121</b>

<b>Figure 54</b> : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>E. hirae</i> de génotype 1.....	<b>122</b>
<b>Figure 55</b> : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>E. hirae</i> de génotype 2.....	<b>123</b>
<b>Figure 56</b> : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>E. sp</i> .....	<b>124</b>
<b>Figure 57</b> : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>E. faecalis</i> .....	<b>125</b>
<b>Figure 58</b> : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat <i>L. plantarum</i> '110' à 30 °C pendant 24 h.....	<b>126</b>
<b>Figure 59</b> : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en, lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats <i>Lb. plantarum</i> ....	<b>127</b>
<b>Figure 60</b> : Caillé du fromage « S ».....	<b>128</b>
<b>Figure 61</b> : Caillé du fromage « C ».....	<b>128</b>
<b>Figure 62</b> : Variation de l'acidité au cours du temps de chacun des quatre isolats utilisés pour la fabrication des levains, cultivés dans 100 ml de lait stérilisé partiellement écrémé à 30°C.....	<b>130</b>
<b>Figure 63</b> : Variation de l'acidité des levains 'S' et 'C' au cours du temps dans le lait « Régilait » incubé à 30°C.....	<b>131</b>
<b>Figure 64</b> : Mesure d'acidité des caillés S et 'C' au cours de la fabrication à partir de lait du commerce pasteurisé et partiellement écrémé.....	<b>132</b>

## RESUME

Les bactéries lactiques (LAB) sont capables de fermenter de nombreux produits animaux et végétaux, produisant entre autres des acides, des composés aromatiques comme le diacétyl et des polysaccharides participant à l'aspect, la texture et la saveur du produit fermenté. Pour les produits laitiers, les LAB fermentant le lait peuvent être apportées par le lait, et/ ou les récipients servant à la fermentation, et/ou des levains. L'industrialisation croissante de la production de produits laitiers fermentés conduit à utiliser de plus en plus des levains. C'est le cas en Algérie. Dans ce contexte, ce travail a pour objectif l'obtention d'un souche de cocci lactiques mésophiles sélectionnés et adaptés à la fermentation de lait pour produire des laits fermentés type *Lben* et des fromages frais *Jben*, deux produits fermentés traditionnellement consommés en Algérie.

79 laits ont été prélevés au niveau de 40 fermes algériennes. Les 84 isolats mésophiles isolés sur milieu MRS-vancomycine et M17 à partir de laits de vache, chèvre, brebis, jument et chamelle, crus et/ou spontanément fermentés, ont été identifiés jusqu'au niveau souche au moyen de méthodes moléculaires basées sur la PCR, Rep-PCR et PCR spécifiques. Ces mêmes isolats ont subi aussi une identification phénotypique basée sur des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques comme la tolérance à différentes valeurs de pH, de températures et de concentrations en sel, la recherche de l'existence ou non de la catalase, de l'hydrolyse de l'arginine et de l'utilisation de sucres. Ces isolats ont subi enfin une caractérisation technologique comprenant l'étude a/ de leur pouvoir acidifiant, par mesure du taux d'acidité titrable et des valeurs de pH au cours d'une culture en lait, b/ de leur pouvoir aromatisant lié à l'utilisation du citrate, et c/ de leur pouvoir protéolytique lié à la présence d'une protéase. Cette étude a été complétée par des essais de fabrication de fromages à pâte fraîche de type « *Jben* », avec deux combinaisons d'isolats *Lactococcus lactis* issus du souche ou un levain commercial; ces fromages ont été analysés d'un point de vue physico-chimique et sensorielle, et comparés à un fromage commercial. Par les méthodes moléculaires, 90% des isolats (77 isolats) ont été affiliés à sept espèces et sous espèces appartenant à quatre genres de LAB. 48 isolats appartiennent au genre *Entérocoques* avec les espèces *durans*, *hirae*, *faecalis*, et sp., 15 isolats appartiennent au genre *Leuconostoc* avec une seule espèce *Ln. mesenteroides* et trois sous-espèces, *mesenteroides*, *dextranicum* et « *inconnue* », 11 isolats appartiennent au genre *Lactococcus* avec une seule espèce *lactis*, une sous-espèce *lactis* et un biovar *diacetylactis*, et 3 isolats sont des lactobacilles de l'espèce *Lb. plantarum*. Les 84 isolats possèdent 21 génotypes différents, indiquant la présence de 21 souches présentant de grandes différences de potentiel génétique dans le souche. Cette identification moléculaire a confirmé l'identification phénotypique préalable de certains isolats appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Par contre, elle a révélé une prédominance d'entérocoques dans le souche, liée au co-isollement et à la co-purification de ces entérocoques, mais aussi

au manque de fiabilité des identifications basées uniquement sur des critères phénotypiques classiques.

La caractérisation technologique des 84 isolats a montré des différences de capacité acidifiante du lait à 30 °C selon les espèces, et les sous-espèces le cas échéant, conformes à ce qui est connu. Les graphes d'acidité titrable en fonction du pH sont un bon test d'identification phénotypique. Deux souches de *Lc. lactis* parmi les quatre souches de *Lc. lactis* du soucier présentent un profil atypique d'acidification selon la température, avec une acidification à 42 °C similaire à celle d'entérocoques. Sur la base de leur potentiel d'acidification, de leur capacité à dégrader le citrate et de leur innocuité en fabrication, ces deux souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ainsi qu'une souche de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* parmi les quatre souches de *L. mesenteroides* présentes dans le soucier ont été retenues pour constituer des levains acidifiants ; le leuconostoc doit être obligatoirement associé aux lactocoque(s) , en raison de ses faibles potentiels technologiques seuls. Des entérocoques résistants à la vancomycine ont été isolés de laits crus et de lait spontanément fermentés.

La fabrication expérimentale de *Jben* s'est faite sur un schéma de type industriel combinant l'emploi de lait pasteurisé, l'ajout de présure animale et de levains acidifiants. Les isolats sélectionnés à partir du soucier avaient été identifiés sur la base de leur phénotype et présentaient un profil d'acidification typique de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, Ces isolats étaient contaminés avec des entérocoques, mis en évidence et intégrés au soucier à la place des *Lc. lactis* subsp. *lactis* au moment de l'identification moléculaire de ces isolats *a posteriori*. Ces *Lc. lactis* subsp. *lactis* ne font donc malheureusement plus partie du soucier de souches pures actuel. Les deux fromages expérimentaux, fabriqués soit avec une combinaison de 4 isolats du soucier soit avec un levain commercial renfermant 3 souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, présentaient des caractéristiques physico-chimiques à 2 jours typiques d'un *Jben*, excepté leur taux de matière grasse inférieur. Les deux fromages expérimentaux se différenciaient du fromage commercial analysé en parallèle pour 5 des 6 critères sensoriels étudiés, alors que les deux fromages expérimentaux ne différaient entre eux que pour 2 des 6 critères étudiés, aspect externe et saveur acide. Le fromage commercial a été globalement plus apprécié, était moins acide et avait une consistance moins élevée. Ces fabrications constituent une bonne base pour tester, moyennant quelques améliorations, les 3 souches sélectionnées au terme de ce travail.

Mots clés : isolats lactiques, leuconostoc, lactococcus, enterococcus, identification, PCR, acide, pH, fromage, *jben*

## Summary

Lactic acid bacteria (LAB) are able to ferment many animal and plant products, producing among other acids, aromatic compounds such as diacetyl and polysaccharides involved in the appearance, texture and flavor of the fermented product. For dairy products, milk fermenting LAB can be made with milk, and / or containers used for fermentation and / or in sourdough. The increasing industrialization of the production of fermented dairy products led to increasing use of starters. This is the case in Algeria. In this context, this work aims at obtaining a mesophilic lactic cocci Souchier selected and adapted to the fermentation of milk to produce fermented milks and cheeses such Lben fees Jben two fermented products traditionally consumed in Algeria.

79 milk were collected at 40 farms in Algeria. The 84 isolates mesophilic isolated on MRS-vancomycin and M17 from milk cow, goat, sheep, horse and camel raw and / or fermented spontaneously, were identified to strain through molecular methods based on PCR, Rep-PCR and specific PCR. These isolates also underwent phenotypic identification based on morphological, physiological and biochemical tolerance as different values of pH, temperature and salt concentrations, the search for the presence or absence of catalase, the arginine hydrolysis and the use of sugars. These isolates have been finally submitted to a technological characterization including their acidifying potential, by measuring titratable acidity and pH values in milk culture, flavoring via the use of citrate, and their proteolytic activity due to the presence of a protease. This study was completed by testing manufacturing fresh cheese type "Jben", with two combinations of *Lactococcus lactis* isolates derived from "Souchier" or commercial sourdough; these cheeses were analyzed from a physical chemical and sensory point of view and compared to a commercial cheese. By molecular methods, 90% of isolates (77 isolates) were affiliated to seven species and subspecies belonging to four genera of LAB. 48 isolates belong to species of the genus *Enterococcus* with *durans*, *hirae* *faecalis*, and *sp.*, 15 isolates belong to the genus *Leuconostoc* with one species *Ln.* and three *mesenteroides* subspecies *mesenteroides dextranicum* and "unknown", 11 isolates belong to the genus *Lactococcus* present case only with one *lactis* subspecies *lactis* biovar and *diacetylactis*, and 3 isolates of *Lactobacilli* to the species *Lb. plantarum*. The 84 isolates have 21 different genotypes, indicating the presence of 21 strains with large differences in the genetic potential Souchier. . Molecular identification confirmed this phenotypic screening of some isolates belonging to the genera *Leuconostoc* and *Lactococcus*. A predominance of enterococci in "Souchier", related to co-isolation and co-purification of these enterococci, was revealed but also unreliable identifications based solely on conventional phenotypic criteria..

Technological characterization of the 84 isolates showed differences in ability acidifying the milk at 30 ° C depending on the species and subspecies if applicable, in accordance with what is known. Graphs titratable acidity functions of pH are a good test of phenotypic identification. Two strains of *Lc. lactis* among four strains of *Lc. lactis* . "Souchier" have a profile of atypical acidification depending on temperature, with acidification at 42 ° C similar to enterococci. On the basis of their acidification potential, their ability to degrade citrate and their safety in manufacturing, these two strains of *Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* and so one strain of *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* among four strains of *L. mesenteroides* present in the Souchier were selected to form acidifying starters, the Leuconostoc must necessarily be associated with lactococcal (s), because of its low technological potential alone. Enterococci resistant to vancomycin have been isolated from raw milk and fermented milk spontaneously.

Experimental Jben manufacturing is done on a type scheme combining industrial use of pasteurized milk, adding rennet and starter feed acidifiers. Isolates selected from "Souchier" were identified on the basis of their phenotype and showed a typical profile acidification *Lc. lactis subsp. Lactis*. These isolates were contaminated with enterococci, as revealed at the molecular identification of these isolates retrospectively and integrated in "Souchier" instead of *Lc. lactis subsp. lactis*. These *Lc. lactis subsp. lactis* therefore are unfortunately not part of current "Souchier" pure strains. Both experimental cheeses manufactured with either a combination of four isolates Souchier or trading with a leaven contain three strains of *Lc. lactis subsp. lactis* showed physico-chemical characteristics in a typical two days Jben except for their lower fat content. Both experimental cheeses differed from commercial cheese analyzed in parallel for 5 of the 6 sensory criteria studied, whereas the two experimental cheeses differed among themselves by two of the six criteria studied, external appearance and acid taste. Cheese business was generally more appreciated was less acidic and had lower consistency. These manufacturing are a good basis for testing, with some improvements, the three selected strains at the end of this work.

Keywords: lactic isolates, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, identification, PCR, acid , pH, cheese, jben

## الملخص

بإمكان بكتيريا الحليب على تخمر العديد من المنتجات الحيوانية و النباتية، و إنتاج الأحماض العطرية مثل ثنائي الأستيل والسكريات المشاركة في الملمس والمظهر والنكهة. بالنسبة لمنتجات الألبان، يمكن لهذه البكتيريا ان تتواجد بالحليب او العبوات المستخدمة و(او) الخمائر.

قاد التصنيع المتزايد لإنتاج الألبان المخمرة إلى زيادة استخدام الخمائر كما هو الحال بالجزائر. وفي هذا السياق ، يهدف هذا العمل إلى الحصول على Souchier ، مكورات مختارة ، وتكييفها لتخمير الحليب لإنتاج « اللبن » « Lben » و « الجبن » « Jben » الطازج ، اثنين من المنتجات المخمرة المستهلكة بكثرة في الجزائر .

تم جمع 79 عينة في 40 مزارع منتجة للحليب بالجزائر. 84 عزلات عزلت من M17 و MRS + فانكوميسين ، مأخوذة من حليب البقر، الماعز والأغنام والإبل والخيل ، خام و / أو مخمر، وحددت السلالة من خلال الأساليب الجزيئية على أساس PCR، Rep PCR، و PCR محددة. هذه العزلات خضعت أيضا للتحديد المظهري على أساس المورفولوجية ، الفزيولوجية والبيوكيميائية كقيم مختلفة من تركيزات درجة الحموضة و pH ، ودرجة الحرارة والملح، والبحث عن وجود أو عدم وجود الكاتلاز، استخدام أو عدم استخدام أرجينين و السكريات. كذلك خضعت هذه العزلات لتعريف تكنولوجي بما في ذلك دراسة قوتهم المحمضة من خلال قياس درجة الحموضة ، البحث عن استخدام أو عدم استخدام سترات، وبروتين بسبب وجود الأنزيم البروتيني

. تم انتهاء هذه الدراسة بصنع نوع من الجبن الطازج "Jben"، بإستخدام اثنين من مجموعات العزلات اللبينية lactococcus المستمدة من Souchier أو الخميرة التجارية ، وقد تم تحليل هذه الجبن من وجهة نظر الفيزيائية والكيميائية والحسية و مقارنته مع الجبن التجاري.

بواسطة الأساليب الجزيئية، 90٪ من العزلات مع سبعة أنواع وسلالات (77 عزلات) ينتمون إلى أربعة أجناس من LAB. 48 عزلة تنتمي إلى جنس enterococque مع أنواع، durans, hirae, faecalis, sp. 15 عزلات تنتمي إلى leuconostoc مع نوع mesenteroides وثلاثة سلالات mesenteroides, dextranicum, mesenteroides, و سلالة "غير معروفة". 11 عزلات تنتمي إلى جنس lactococcus مع نوع واحد، lactis، ونوع فرعي diacetylactis، و 3 عزلات من، lactobacillus مع 3 أنواع plantarum .

84 عزلات تحتوي على 21 أنماط ، وراثية و 21 سلالات، مع وجود اختلافات كبيرة في Souchier. أكدت الدراسة الجزيئية في تحديد الهوية المظهرية لبعض العزلات تنتمي إلى أجناس lactococcus و leuconostoc ، وقد تبين تغلب enterococque في Souchier، يتعلق ذلك في نقيه هذه المكورات، ولكن لا يمكن الاعتماد على معايير تستند فقط التعريف المظهري.

التعريف التكنولوجي ل 48 عزلات أظهر اختلافات في قدرة تحميض الحليب إلى ° C 30 تبعا للأنواع والسلالات إن وجدت، وفقا لما هو معروف. الرسوم البيانية الدالة على معايرة درجة الحموضة و علاقتها ب pH هي اختبارا جيدا للتحديد المظهري. سلالتين من بين أربعة سلالات lactococcus تكون لمحة عن حمض غير نمطي اعتمادا على

درجة الحرارة مع تحمض في  $42\text{ C}^\circ$  مماثلة ل *enterococque* على أساس قدرتهم على إستخدام سترات وسلامتهم في مجال التصنيع. هذه السلالتين من *lactococcus* وسلالة من *leuconostoc mesenteroides* من بين الأربعة سلالات قد تم إختيارهم من Souchier لتشكيل خمائر محمضه. يجب بالضرورة أن تترا فق *lactococcus* مع *leuconostoc*، وذلك بسبب ضعف قدرة *leuconostoc* كونها لوحدها. وقد تم عزل *enterococque* من الحليب الخام والحليب المخمر تلقائيا

يتم تصنيع تجريبي للجبن على مخطط نوع الجمع بين استخدام الصناعي من الحليب المبستر، مضيفا إليه إ نزيم حيواني *présure* و خميرة للتحميض. وقد تم تحديد العزلات المختارة من Souchier على أساس النمط الضهري وأظهر التحمض أن *lactococcus* كانت ملوثة مع عزلات *enterococque* ، بالتالي فهي جزءا من سلالات نقيه . كل الأجبان المصنعة التجريبية تحتوي إما على أربعة عزلات من Souchier أو خميرة تجارية مكونة من ثلاث سلالات ، وأظهرت الخصائص الفيزيائية والكيميائية بعد يومين ، نموذجية الجبن باستثناء انخفاض محتواها من الدهون. اختلف كل من الجبنين التجريبيين عن جبن السوق ب5 من المعايير الحسية 6 التي درست ، في حين أن الجبنين التجريبيين لم يختلفا فيما بينهما إلا باثنين من المعايير 6 التي شملتها الدراسة : المظهر الخارجي والذوق الحمض. جبن السوق عموما كان أقل حموضية ، وكان أقل الاتساق ، هذه النتائج هي أساس جيد للاختبار، مع بعض التحسينات، والسلالات الثلاث المحددة في نهاية هذا العمل.

**كلمات مفتاحية:** *leuconostoc* ، العزلات، اللبنية ، *lactococcus*، *enterococque* تحديد، سلالة ، PCR , درجة الحموضة ، التعريف. ، خمائر، الجبن، النوع



# Introduction

# INTRODUCTION

Depuis l'Antiquité, les bactéries lactiques (LAB) ont été utilisées sans connaître leur existence. En effet la transformation du lait en fromage était un moyen de conservation du lait (Ramet, 1993). D'autres aliments aussi se conservaient par fermentation en utilisant des levains artisanaux. Ce n'est que pendant la deuxième moitié du dix-huitième siècle que des scientifiques découvrirent le rôle des bactéries lactiques dans la fermentation naturelle d'aliments crus tel que le lait, les viandes ou encore les végétaux (Burguière, 1999). Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconversion optimale et d'une texture caractéristique des produits fermentés et transformés, comme les produits laitiers, les dérivés de matières premières agricoles, les produits alcoolisés, les viandes, etc.... (Novel, 1994). Ces atouts se situent dans l'aptitude à l'acidification, à l'aromatisation, à la protéolyse etc..... Le développement de l'industrie alimentaire, en particulier de l'industrie laitière, a permis de sélectionner de nouvelles souches à fort intérêt technologique par la connaissance de leur métabolisme, de leur physiologie, de leur propriétés fonctionnelles et par la maîtrise des mélanges de levains lactiques pour la production de levain industriel; ces levains permettent d'aboutir à des produits de qualité organoleptique, gustative, nutritionnelle, fonctionnelle et hygiénique plus constante, et à des procédés plus performants (Cachon et al ,2002).

L'Algérie est un pays traditionnellement consommateur de produits laitiers fermentés, qui étaient jusqu' à une date récente fabriqués en milieu rural, principalement pour l'autoconsommation, par fermentation spontanée des laits crus produits localement. L'urbanisation a transformé les modes de production, rendant l'ajout de levains incontournable, en premier lieu celui de levains lactiques. L'Algérie importe actuellement ces levains lactiques, qui ont un coût de revient élevé et qui n'ont pas été conçus pour fabriquer les produits fermentés traditionnels; alors pourquoi ne pas essayer de réaliser nos propres levains adaptés à la fabrication des produits laitiers traditionnellement consommés en Algérie? Tel est l'objectif de ce travail. Les travaux faits à la fin du siècle dernier et au tout début de celui-ci avaient montré l'abondance des coques lactiques mésophiles, leuconostocs et lactocoques, dans les laits et fromages frais traditionnellement fermentés en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (Benkerroum et Tamine, 2004), suggérant leur rôle majeur comme starter.

Ce travail a consisté à obtenir un souche de bactéries lactiques mésophiles acidifiantes à partir d'échantillons de laits crus les plus différents possible, puis à caractériser les souches de manière à pouvoir sélectionner celles ayant le meilleur potentiel

technologique pour fabriquer des produits laitiers traditionnels. Certaines souches ont été utilisées pour fabriquer des fromages frais type *Jben*. Ce travail a été réalisé en grande partie en Algérie au sein du laboratoire substances Naturelles et LAMAABE de l'Université de Tlemcen, et pour la partie caractérisation moléculaire en France au sein de l'Unité de Recherches en Technologie et Analyses Laitières (INRA, Poligny). Le travail de caractérisation moléculaire n'a malheureusement pu être fait que postérieurement à tous les autres, alors qu'il aurait été préférable qu'il soit fait avant tous les autres.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique qui résume, dans un premier chapitre des généralités sur le lait, puis, dans un deuxième chapitre, des généralités sur les bactéries lactiques, en particulier sur les mésophiles acidifiantes, et enfin dans un troisième chapitre, dresse un panorama des produits laitiers traditionnels algériens après avoir brossé les grands traits de la technologie fromagère. Ce manuscrit se poursuit par la description des méthodes et matériels utilisés, comprenant l'isolement des souches, la caractérisation moléculaire et phénotypique des souches, la fabrication de fromage frais, et l'analyse des fromages fabriqués. Il se termine par la présentation, puis la discussion des résultats obtenus.

Volontairement, ce manuscrit n'inclut pas tous les résultats obtenus sur ces isolats, malgré le temps important qui y a été consacré. En effet, il n'inclut pas les résultats relatifs à la production de CO<sub>2</sub> par les leuconostocs, car la cinétique d'accumulation de CO<sub>2</sub> n'apporte pas d'information supplémentaire, étant fortement liée à la cinétique d'accumulation d'acide, acide et CO<sub>2</sub> étant issus de la même voie métabolique. Il n'inclut pas aussi les résultats relatifs à l'effet antagoniste des isolats lactiques vis-à-vis d'isolats pathogènes et d'altération en milieu modèle car ces résultats n'apportent pas d'informations supplémentaires sur le potentiel technologique de ces souches. En effet ces effets mettent en œuvre des compétitions métaboliques entre microorganismes ou la production en quantité suffisante de composés inhibiteurs, qui doivent intervenir avant toute multiplication ou activités des microorganismes indésirables ou pathogènes, sans perturber le processus de fabrication de manière à ne pas modifier les caractéristiques souhaitées pour le produit. C'est pourquoi ces effets antagonistes doivent être étudiés en conditions fromagères réelles, c'est-à-dire après ensemencement éventuel de laits, ayant subi le traitement adapté au type de produit souhaité en terme de refroidissement, chauffage, écrémage, etc., avec toutes les microflores devant être apportées, en quantité et en proportion adaptée au type de produit souhaité. C'est ainsi que les nombreuses souches pour lesquelles des études détaillées de la production de bactériocines ont été réalisées et pour lesquelles un effet inhibiteur a été prouvé en conditions modèles n'ont pas pu prouver leur efficacité en conditions normales de fabrication. C'est ainsi que la nisine, la bactériocine la plus étudiée, à large spectre d'action envers les bactéries à Gram positif, est ajoutée directement (ce n'est pas le lactocoque qui

est ajouté; il sert simplement de producteur) et son ajout nécessite en fabrication fromagère d'utiliser des levains rendus résistants à son action par voie génétique, rendant donc l'utilisation de la nisine réservée à quelques applications très spécifiques (Delves-Broughton, 2005).



**Partie 1**

***SYNTHESE***

***BIBLIOGRAPHIQUE***



# CHAPITRE I

*Le lait*

## I. LE LAIT

### I-1 Définition

Selon le congrès international de la répression des fraudes de 1909, le lait est le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (Bourgeois et Larpent 1996). Le dictionnaire de terminologie de la Fédération Internationale de laiterie (FIL) et le code FAO/OMS indiquent que c'est «le produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ou soustraction» (Luquet et al, 1985).

Le décret français du 25 mars 1924 précise que la dénomination «lait», sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination «lait» suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient : « lait de chèvre », « lait de brebis », etc. (Bourdier et Luquet, 1981). Les mêmes règles de dénomination sont appliquées en Algérie.

En Algérie comme en France : «Ne peut pas être considéré comme propre à la consommation humaine (article 2 du décret Français du 25 mars 1924 modifié et complété par le décret n° 71-6 du 4 janvier 1971 (Bourdier et Luquet, 1981) :

1-Le lait provenant d'animaux atteints de maladie dont la nomenclature sera donné par arrêté du ministère de l'agriculture pris sur avis du comité consultatif des épizooties,

2-le lait coloré, malpropre ou malodorant,

3-le lait provenant d'animaux mal nourris et manifestement surmenés,

4-le lait contenant des antiseptiques ou des antibiotiques,

5-le lait coagulant à l'ébullition.

### I-2 Caractéristiques générales

Le lait apparaît comme un liquide opaque blanc mat plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$  carotènes de la matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable. Le lait ne contient qu'un seul type de glucide, le lactose, susceptible de se dégrader en acide lactique.

Le lait est généralement considéré par les spécialistes de la santé et de la nutrition comme un aliment très complet, équilibré en nutriments, riche en minéraux et contenant presque toutes les vitamines, à l'exception notable, des vitamines liposolubles A et D pour le lait écrémé (tableau 1). Les matières grasses laitières sont toutefois riches en acides gras saturés et contiennent des acides gras trans. Le minéral manquant le plus significatif est le fer, qui doit faire l'objet d'un complément. (Brulé, 1997)

Le lait est caractérisé par différentes phases en équilibre instable.

- une phase aqueuse contenant en solution des molécules de glucides, des minéraux et des composés azotés non protéiques,
- des phases colloïdales instables constituées de deux types de colloïdes protéiniques, une suspension colloïdale contenant les micelles de caséines et une solution colloïdale contenant les protéines hydrophiles telles que les protéines sériques et des globules gras en émulsion dans la phase aqueuse.

**Tableau 1** : Teneur en vitamines de différents types de laits (par litre)  
(<http://www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F Oc.htm>)

Vitamines	Lait pasteurisé			Lait UHT			Lait stérilisé	
	Entier	Demi-écrémé	Ecrémé	Entier	Demi-écrémé	Ecrémé	Entier	Demi-écrémé
A (mg)	0,55	0,25	Traces	0,55	0,25	Traces	0,55	Traces
D (µg)	0,30	0,01	Traces	0,30	0,10	Traces	0,30	Traces
C (mg)	8	8	8	1	1	1	0,8	0,8
B1 (mg)	0,40	0,35	0,40	0,1	0,39	0,40	0,30	0,31
B2 (mg)	1,67	1,83	1,83	1,83	1,85	1,77	1,48	1,48
B6 (mg)	0,60	0,61	0,65	0,44	0,49	0,47	0,39	0,41
B12 (µg)	3,60	3,90	3,80	2	2	2,3	1	0,90
Acide panto- thémique (mg)	3,60	3,14	3,20	3,26	3,38	3,28	2,94	3,33
Acide nicobinique (mg)	0,83	0,89	0,89	0,91	0,97	0,98	0,95	1,2
Biotine (mg)	20	21	23	19	19	17	19	21
Folates (µg)	57	58	53	8	19	12	2	3

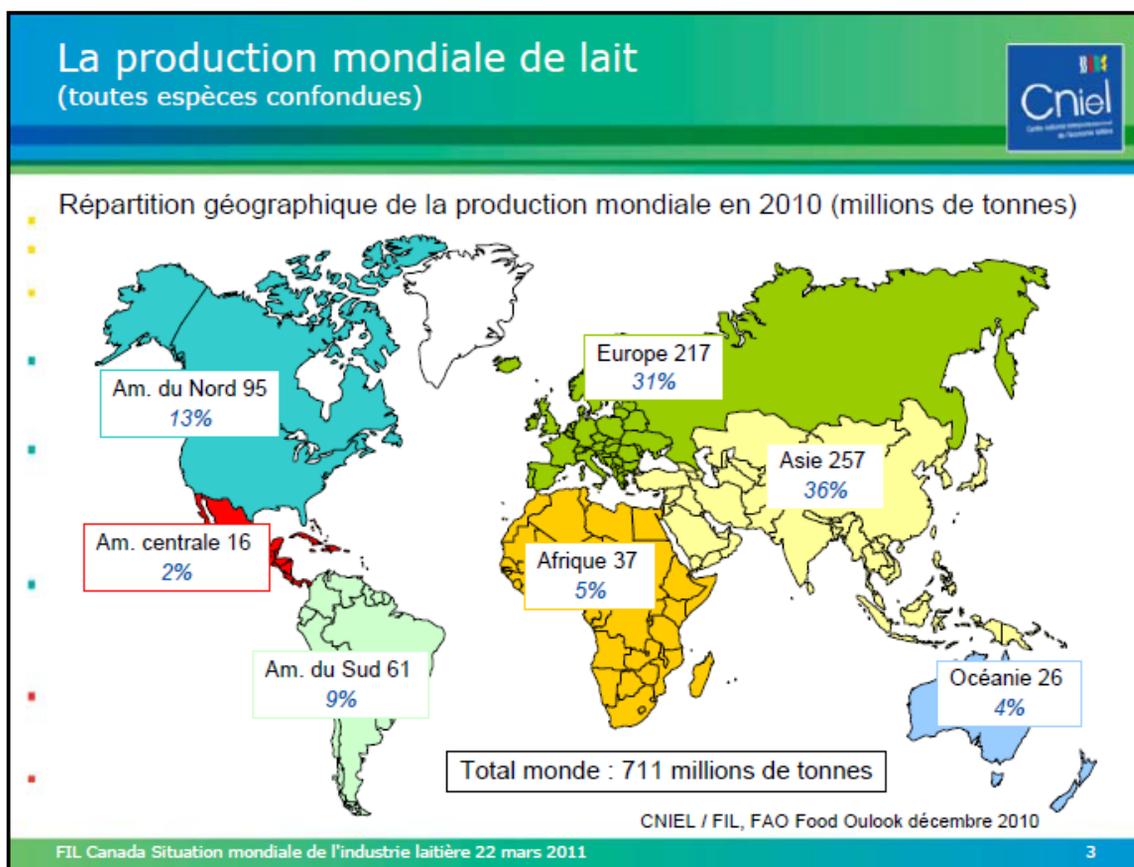
Source: Renner, 1989.

Le lait est un liquide physiologique extrêmement fragile à l'état naturel (lait cru) car il renferme des germes dont le nombre et la nature dépendent (Bourdier et Luquet, 1981) :

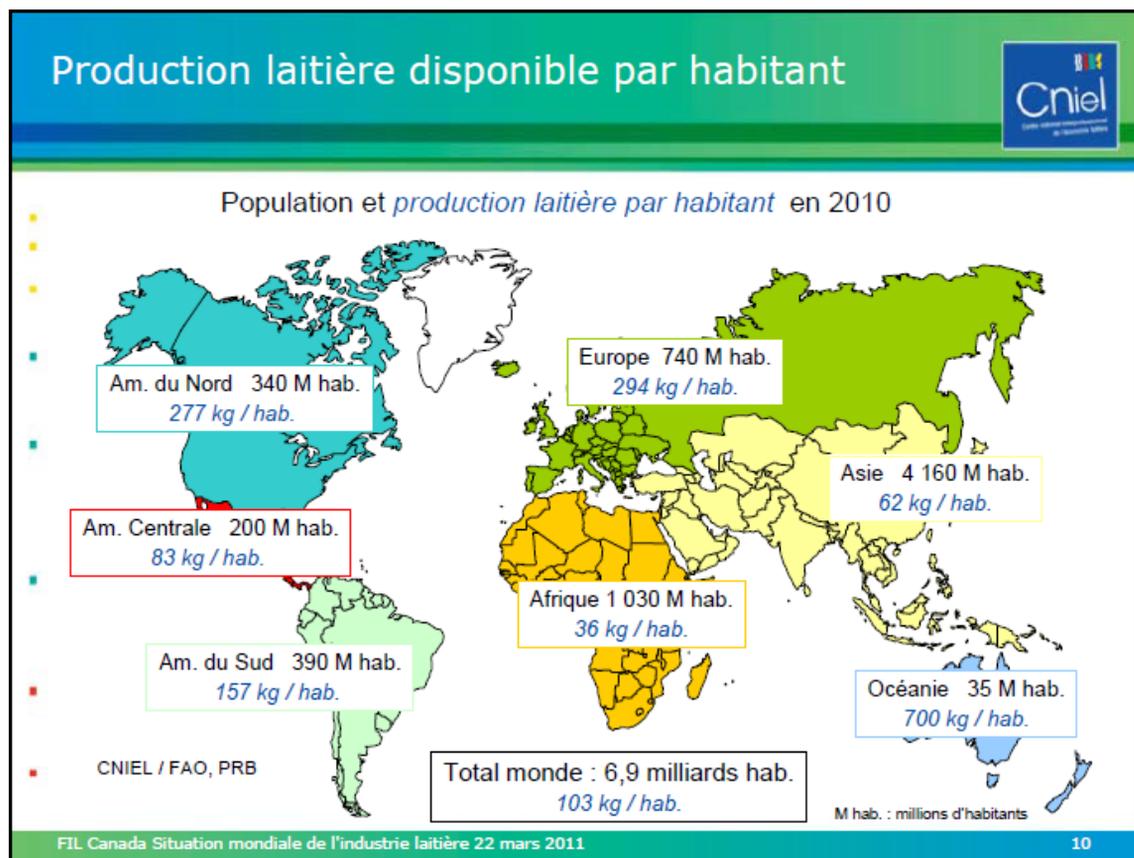
- de la propreté des animaux
- de l'hygiène des personnes qui le recueillent,
- de la propreté des ustensiles servant à la traite (machine à traire, seaux, tanks),
- de la température de conservation,
- et du temps de conservation avant transformation.

### I-3 Situation de l'Afrique dans la production mondiale de lait

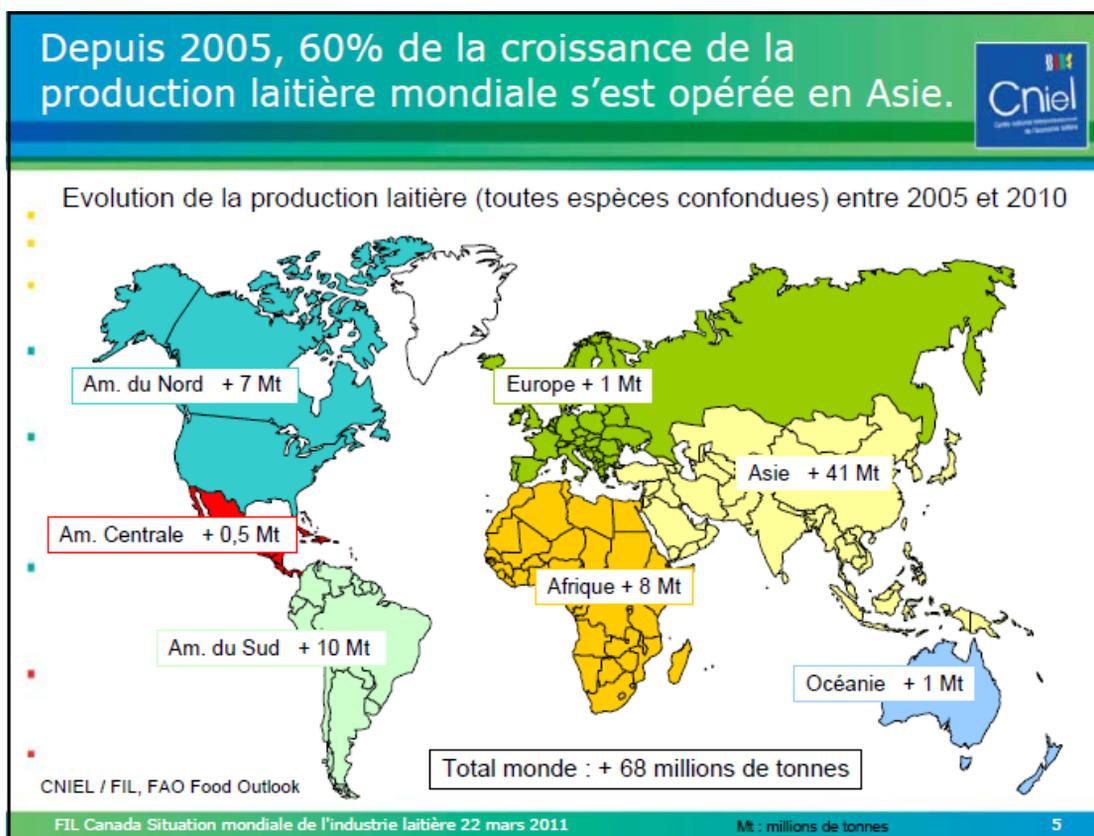
En 2010 (derniers chiffres disponibles), la production mondiale de lait était de 7116 millions de tonnes réparties de façon inégale selon les grandes régions géographiques et le nombre d'habitants de ces régions (figures 1 et 2). L'Afrique est la région qui produit le moins de lait par habitant. La production mondiale a augmenté entre 2005 et 2010 dans toutes les régions, surtout en Asie (figure 3). Selon les projections, le déficit laitier qui existe en Afrique va s'amplifier (figure 4).



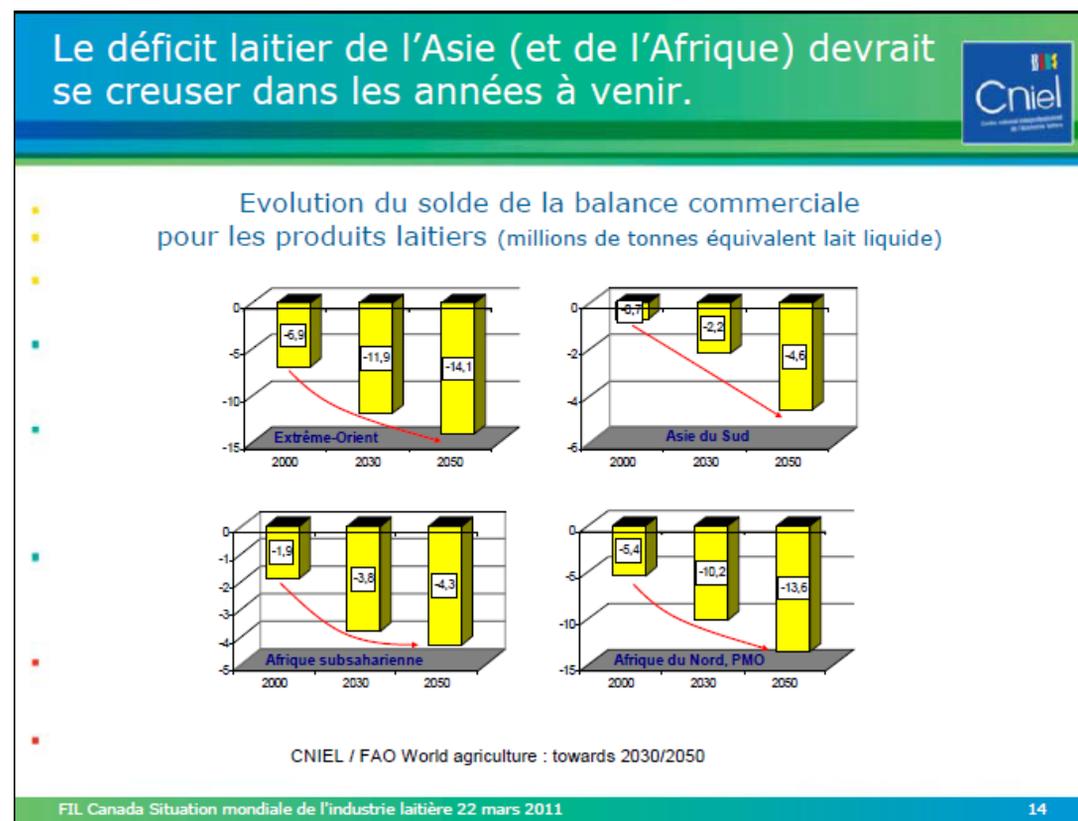
**Figure 1 :** Variation géographique de la production de lait en 2010 (FIL, 2011)



**Figure 2 :** Variation géographique de la production de lait selon le nombre d'habitant en 2010 (FIL, 2011)



**Figure 3 :** Variation géographique de l'augmentation de la production laitière entre 2005 et 2010 (FIL, 2011)



**Figure 4 :** Déficit laitier prévisionnel jusqu'en 2050 pour les quatre grandes régions géographiques mondiales déficitaires (FIL, 2011)

En 2010, le lait produit au niveau mondial était à 83 % du lait de vache, 13 % du lait de bufflonne, 2 % du lait de chèvre, 1 % du lait de brebis et 0.2 % du lait de chamelle (<http://www.produits-laitiers.com/economie-et-societe/filiere/monde/>). Mondialement le lait de vache est le plus produit. L'élevage de chameau est limité à l'Afrique et à l'Asie (d'autres espèces de camélidés existent en Amérique du Sud). La production mondiale du lait de chamelle disponible pour la consommation humaine a été estimée officiellement à 1.3 millions de tonnes en 2006, soit 500 fois moins que celle du lait de vache. Les chiffres parlent d'une production mondiale totale de 5,3 millions de tonnes destinées principalement aux chamelons. Une chamelle allaitante produit de 1000 à 12000 litres de lait pendant une période allant de 8 à 18 mois. Le premier producteur mondial du lait de chamelle est la Somalie (environ 50 % de la production) suivie de l'Arabie Saoudite (environ 7 % de la production) (<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/dairy/camel.html>).

La production de lait de brebis est importante dans les pays où la production de lait de vache est limitée, mais elle concerne également des pays de grande tradition fromagère comme la France.

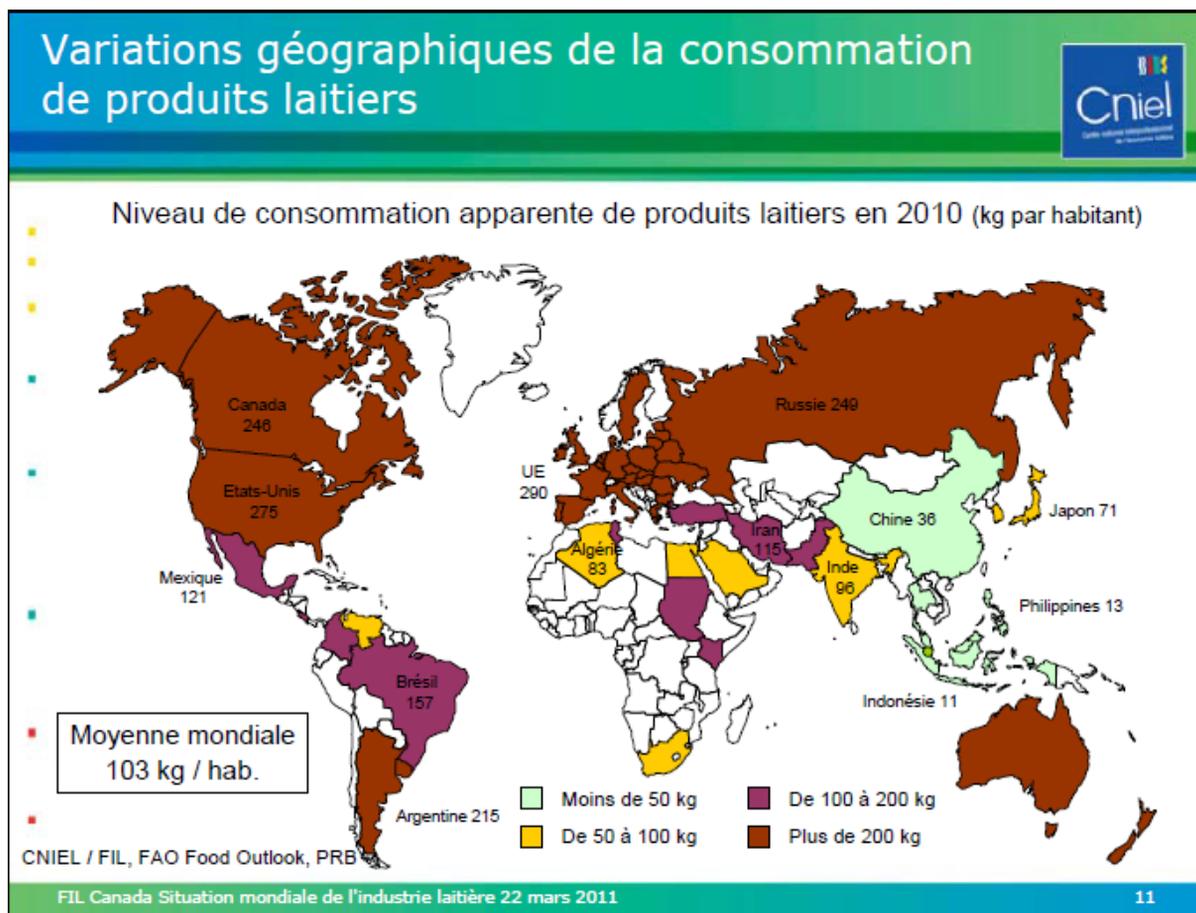
#### **I-4 Production et consommation de lait en Algérie**

La plupart des informations disponibles sont tirées d'articles de presse, donc sont des informations de seconde main.

Au cours des années 1990, le lait produit par les troupeaux algériens était à 60% du lait de vache, 26 % du lait de brebis, et 13% du lait de chèvre (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Algeria/Algerie.htm>). La part du lait de vache a augmenté au cours des années 2000 au détriment de celles de laits des autres espèces, atteignant 73% de la production totale en 2008 avec 1,6 millions de tonne de lait de vache sur un total de 2.2 millions de tonne toutes espèces confondues, d'après un article de presse algérien (<http://www.tamanrasset.net/modules/news/article.php?storyid=1232>). La collecte de lait cru de vache pour l'industrie a atteint, en 2011, 0, 572 millions de tonnes, en constante progression depuis 1997, mais représentant toujours une faible partie de la production totale des troupeaux. Le reste du lait, donc la majeure partie du lait produit, sert à l'autoconsommation, à l'alimentation des veaux et à la transformation artisanale (Kaci et Sassi, 2007).

L'Algérie est un des plus gros importateurs de lait au niveau mondial. D'après l'article déjà cité (<http://www.el-annabi.com/economie/1782-l-experience-francaise-pour.html>), 50% des besoins, estimés en tout à 5 millions de tonnes en 2011, doivent être couverts par des importations, le plus souvent de poudre de lait de vache. L'industrie de transformation dépend donc beaucoup des importations.

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et parmi les plus gros pays consommateurs laitiers africains (figure 5). La consommation de lait en Algérie reste cependant loin derrière la consommation européenne qui est de plus de 200 litres/an. Selon des estimations ((Kaci et Sassi, 2007), elle était de 98 litres/an/habitant en 2004, en forte augmentation par rapport aux années précédentes.



**Figure 5** : Variation géographique de la consommation apparente de produits laitiers en 2010 (FIL, 2011)

La consommation annoncée pour l'Algérie en 2010 est en-deçà des consommations estimées figurant dans les autres documents consultés, qui ferait passer l'Algérie en violet, aux côtés de la Tunisie. Néanmoins, cette figure reste intéressante pour visualiser les grandes tendances de consommations relatives entre pays.

Avec 19 millions de tête en 2001, dont plus de 10 millions de brebis (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Algeria/Algerie.htm>), le cheptel ovin est le cheptel le plus nombreux en Algérie (80 % de l'effectif global dans les années 1990), occupant le 14<sup>ème</sup> rang mondial dans les années 1990

(<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/PDF%20files/Algeria-French.pdf>). Il est principalement localisé dans les régions arides dont les disponibilités alimentaires sont

déficiantes. Le nomadisme concerne 60 % des effectifs tandis que se développe la sédentarisation des troupeaux situés en zones céréalières. La viande, la laine, et, dans une moindre mesure le lait, demeurent des productions traditionnelles assurées principalement par trois races locales, *Ouled Djellel* (58 %), *Hamra* (21 %) et *Rembi* (12 %). Le lait est simplement utilisé pour la consommation familiale, le surplus étant destiné à la production de beurre, mais sans aucun circuit de commercialisation. Il n'y a aucune industrie travaillant le lait de brebis en Algérie.

(<http://www.pleinchamp.com/elevage/ovins-caprins/actualites/etranger-en-algerie-100-000-familles-vivent-de-l-elevage-ovin>).

Le cheptel caprin, dont 50 % de chèvres, est le deuxième cheptel avec 13 % de l'effectif total (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Algeria/Algerie.htm>). Selon la FAO (2006), l'Algérie est classée en 15<sup>ème</sup> place dans la production mondiale de lait de chèvre avec un chiffre de 160 000 tonnes pour l'année 2005. Il est réparti sur tout le territoire dans les zones difficiles, zones montagnardes, hauts plateaux et régions arides (Badis et al., 2005).

Les caprins fournissent du lait (chèvre), de la viande, de la peau (bouc) et des poils qui sont recherchés et se vendent facilement. Il existe 3 à 4 millions de têtes appartenant toutes à des populations traditionnelles et à quatre types principaux. Le type dominant est la chèvre *Arabe* (*Arabia*) composant la population dite arabo-maghrébine, le deuxième est le type *Makatia* issu de multiples croisements à partir de races méditerranéennes connues pour leur production laitière, puis le type *Chèvre du M'ZAB* faisant partie du rameau du Nubio-syrien et connue pour ses capacités laitières, et enfin la chèvre de type Kabyle, qui est appréciée pour sa viande mais une mauvaise laitière, avec le type proche appelé *Montagnarde des Aurès* appréciée pour ses poils (<http://www.nouara-algerie.com/article-les-races-caprines-en-algerie-le-poids-de-la-tradition-44853066.html>). Le lait de chèvre est autoconsommé.

L'élevage bovin est cantonné au nord de l'Algérie et ne représentait dans les années 1990 que 6 % de l'effectif global. Comme revu par Guerra dans sa thèse (2007), la production laitière bovine est assurée par un cheptel de vache laitière représentant environ 60 % du cheptel bovin et composé à hauteur de 78% de la race locale appelée «race brune de l'Atlas» peu productive et localisée surtout dans les régions montagneuses, et, à hauteur de 22 %, de races plus productives importées d'Europe (comme les races «Frisonne hollandaise ou française Pie noire», «Prim' Holstein», «Tarentaise», «Brune» et «Pie rouge Montbéliarde») ou issues d'un croisement entre la race locale et une race importée. Cette production provenait en 2008 d'un effectif de vaches laitières de 990 000 têtes, l'effectif ayant été stable et autour de 800 000 têtes entre 1990 et 2005 (Guerra, 2007).

L'Algérie possède un faible cheptel camelin, comparé à plusieurs autres pays africains et asiatiques (figure 6). L'effectif camelin algérien n'a pas évolué au cours de ces dernières décennies (150.000 têtes en moyenne). Il a diminué d'environ 40 % au cours du XX<sup>ième</sup> siècle. (Ben Aissa , 1989). L'élevage est surtout orienté vers la production de viande, la production de lait étant secondaire du fait de faibles productivités et de l'inexistence de débouchés bénéfiques (Lhoste, 2003). La production de lait de chamelle en Algérie n'est pas tellement étudiée et les quelques chiffres disponibles ont été obtenus sur la base d'enquêtes et non de mesures ni de suivis (Lhoste, 2003). D'après les sources de la FAO, (2002) la production laitière cameline en Algérie était de 8000 tonnes en 2001. En général les camelins ne sont pas considérés comme producteurs de lait. Le lait n'est pas considéré comme le principal produit camelin, en raison des faibles potentialités laitières du cheptel camelin. Cette faible productivité est d'autant plus accentuée que ce lait n'est pas du tout valorisé et n'est pleinement utilisé que pour l'allaitement des chamelons et l'autoconsommation. L'excédent de la traite de lait n'est utilisé que pour l'autoconsommation, et cela après que le chamelon ait tété sa mère. La production de lait entre dans l'alimentation des bergers isolés lors du nomadisme. La production laitière n'est ni vendue ni échangée, quelle que soit son importance. La production laitière des chamelles varie d'une région à l'autre, en fonction de la race, de l'individu, de l'alimentation, etc. Les estimations faites par quelques auteurs, donnent des valeurs allant de 0,5 à 10 kg/jour, avec des durées de lactation de 12 à 18 mois. Il n'ya pas de populations ou de races spécialisées en production de lait, mais surtout des individus plus performants qui peuvent atteindre des productions élevées ; ces individus performants ne sont jamais conduits comme des animaux laitiers (alimentation, utilisation pour d'autres travaux et services, etc.) et sont toujours menés, comme tout le cheptel camelin, en élevage extensif.

Le cheptel de chevaux est d'environ 100 000 têtes dont 41 800 dans les exploitations agricoles utilisé comme animal de trait, le reste étant destiné aux fêtes traditionnelles et aux fédérations d'équitation (Rahal, 2004). Le lait est utilisé exclusivement pour nourrir les poulains. En Algérie, l'élevage des chevaux connaît un désintéressement suite à plusieurs facteurs comme le prix élevé des bêtes, la cherté de l'aliment et l'absence de suivi vétérinaire. Considéré comme symbole de bravoure et de fierté chez les Bédouins algériens, le cheval est aussi utilisé pour l'équitation traditionnelle (*fantasia*), lors des grandes célébrations traditionnelles comme les mariages et la *waada*, dans les courses hippiques et pour l'équitation de loisir. Il existe deux races pures, *Barbe* originaire du Maghreb et pratiquement disparue et *Pur sang Arabe*, et une race croisée appelée *Barbe arabe* (Yahiaoui, 2008), <http://www.algeria.com/forum/.../26646-l-élevage-équin-en-algérie>

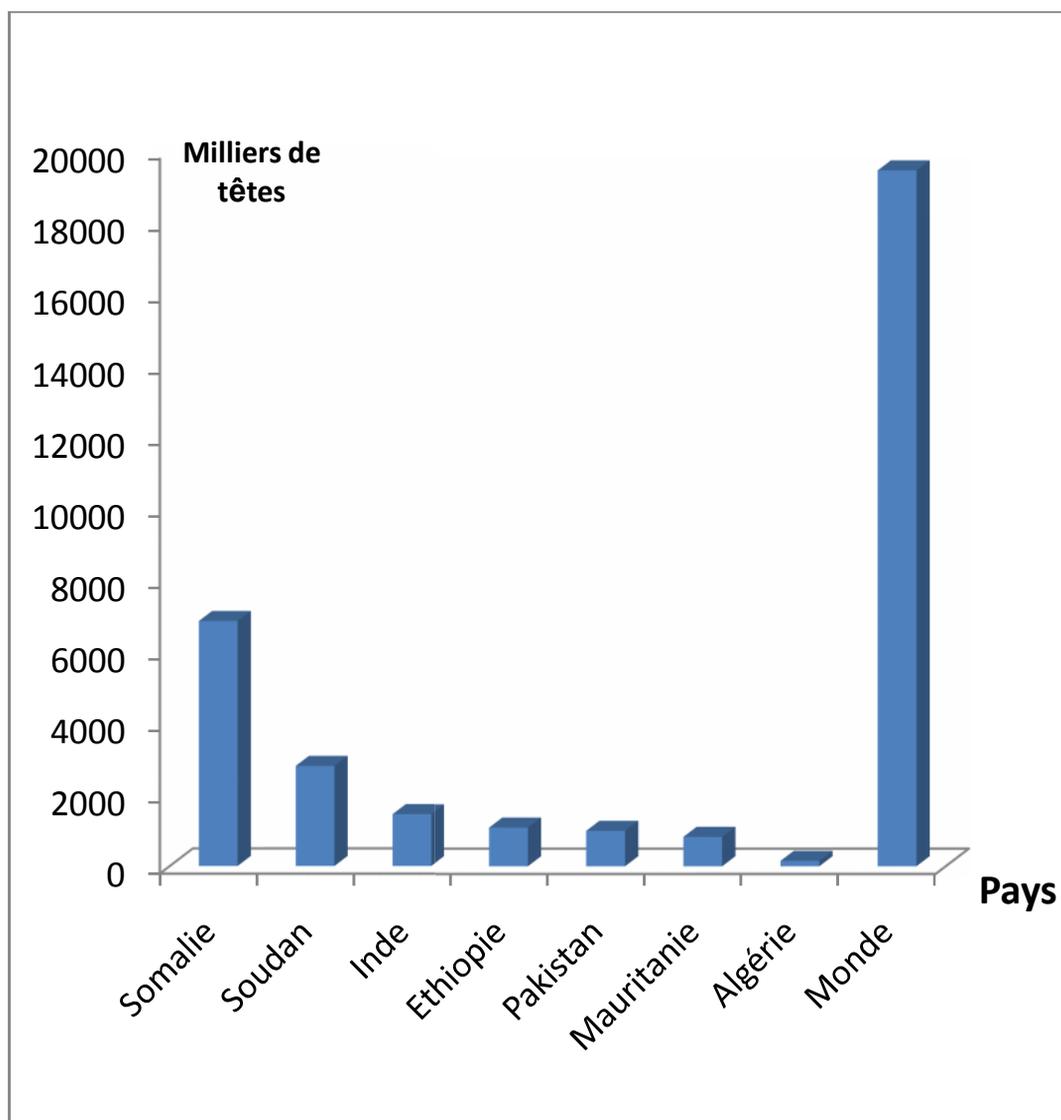


Figure 6 : Principaux pays éleveurs de chameaux (FAO ,2006)

### I-5 Caractéristiques du lait selon les espèces

Les caractéristiques physico-chimiques des différents laits sont regroupées dans les tableaux 2, 3, 4, 5 et 6. Les valeurs moyennes données dans les tableaux ne rendent pas compte de la variabilité, qui peut être très importante, selon la race, l'alimentation, la saison, l'ancienneté des valeurs, etc. Un exemple particulièrement significatif de cette variabilité a été publié en 2008 par Konuspayeva et al, pour les valeurs de la grosse composition du lait de chamelle. Ainsi, selon les études sur lesquelles se basent les revues, les valeurs moyennes varient. Nous présentons néanmoins ces tableaux car les grandes tendances y figurent. De même, les valeurs des tableaux ne correspondent certainement pas à celles prévalant dans la majorité des laits produits en Algérie. Nous n'avons pas trouvé suffisamment de données pour dresser un panorama de la composition des laits algériens.

**Tableau 2** : Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (g/l) (<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F04.htm>). N. B. Les valeurs de protéines et de matière grasse du lait de jument sont particulièrement élevées par rapport à celles de la revue de Park et al. (2006) (respectivement 21.4 et 12.1)

Constituants	Vache	Bufflonne	Chamelle	Jument	Chèvre	Brebis
Extrait sec total	128	166	136	109	134	183
Protéines	34	41	35	25	33	57
Caséine	26	35	28	14	24	46
Lactose	48	49	50	60	48	46
Matières salines	9	8	8	4	7,7	9
Matières grasses	37	68	45	20	41	71

Source: Compilation de diverses sources.

### ***I-5 1. Lait de vache***

C'est le lait qui a été le plus étudié et qui sert de référence. Le lait de vache est le lait produit par la vache pour alimenter son veau. En raison de sa valeur symbolique le lait de vache est un aliment très largement consommé sur l'ensemble de la planète et l'être humain est le seul mammifère qui continue à se nourrir de lait à l'âge adulte pour une moyenne de 25 grammes par jour grâce à la pratique de l'élevage ([fr.wikipedia.org/wiki/Lait\\_de\\_vache](http://fr.wikipedia.org/wiki/Lait_de_vache)). Il contient, comme tous les laits, des matières grasses et des protéines (tableau 2), de nombreux minéraux comme le calcium et le phosphore (tableau 5), des vitamines (tableau 6) et spécifiquement de l'hormone de croissance du veau. Le lait de vache peut être plus ou moins transformé, et forme la principale matière première de l'industrie laitière mondiale.

### ***I-5 2. Lait de brebis***

A l'observation visuelle, il est d'une couleur blanche nacré ou porcelaine, avec une opacité blanche plus marquée que celle des laits de vache et de chèvre. Il a une saveur riche à cause de son taux de matière grasse élevé et de la lipolyse qui peut avoir lieu.

#### *Caractéristiques physiques et (bio) chimiques*

D'après Haenlein. et Wendorff (2006),

Les tableaux présentés montrent les mêmes tendances que celles décrites dans cette revue. Les auteurs n'incluent pas de données sur les laits algériens. Nous n'en avons pas trouvé non plus.

Comparé aux laits de vache et chèvre, la plupart des laits de brebis analysés

- ont des teneurs plus élevées en matière solide, matière grasse et protéique, lactose et minéraux. Ainsi, généralement, moins de lait de brebis que de vache est nécessaire pour fabriquer une même quantité de fromage. Le lait de brebis est un des laits les plus riches en

protéines (tableaux 2 et 4) avec 12.6 g/l en moyenne- et en matière grasse (tableau 2), avec en moyenne 70-75 g/l. En particulier, il contient beaucoup d' $\alpha$ -caséine (tableau 4).

Le lait de brebis est riche en protéines sériques (tableau 4). La richesse du lait de brebis en protéines sériques est surtout due à une teneur élevée en  $\beta$ -lactoglobuline et en immunoglobulines (tableau 4).

- ont une composition qualitative de la matière grasse différente, avec plus d'acides gras à chaîne moyenne, et d'acides gras mono et polyinsaturés.

- sont déficients en agglutine.

- posséderaient des quantités d'enzymes plus basses pour nombre d'entre eux par rapport au lait de vache.

- sont plus riches en minéraux (tableau 5), dont le Ca, le P, le Mg, le Zn, le Cu et le Fe. Le lait de brebis étant très minéralisé, sa capacité tampon est élevée (tableau 3)

- seraient plus riches en vitamines, sauf en carotène (tableau 6)

Ainsi, les laits de brebis, généralement

- sont plus riches en énergie (tableau 3) à cause de leur richesse en lipides et protéines)(tableau 2), plus acides, et plus visqueux (tableau 3) à cause de leur richesse en matière grasse)(tableau 2).

- présentent une tension superficielle à 15°C de 45 à 49 dynes cm, plus faible que celle du lait de vache et de chèvre (tableau 3)

- ont des micelles de caséines de diamètre plus élevé, contenant plus de calcium par gramme de caséine, et ayant un rapport volume/surface plus faible que le lait de vache conférant au lait de brebis des caractéristiques de coagulation particulières : il coagule plus vite et donne un coagulum plus ferme que le lait de vache.

- ne voient pas leurs propriétés physico-chimiques altérées par le refroidissement à 4°C comme le lait de vache.

#### Caractéristiques nutritionnelles/santé

Il a toujours été considéré comme un lait ayant des caractéristiques nutritionnelles/santé spécifiques (cf. composition physico-chimique), et, dans certains cas, comme étant un produit plus noble que les autres (Luquet et al, 1985). Les caractéristiques nutritives du lait de brebis n'ont pas fait l'objet d'études particulières. Pourtant, il est décrit comme étant une excellente source en nutriments pour l'alimentation humaine, avec une meilleure performance que le lait de vache pour apporter les dix acides aminés essentiels. Il apporte aussi des quantités appréciables de calcium, phosphore et riboflavine, et les acides gras souhaités en quantité et en qualité. Il est aussi mieux accepté pour remplacer le lait de vache en cas d'allergie à ce dernier.

### ***I-5 3. Lait de chèvre***

Le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache à cause de l'absence de  $\beta$ -carotène, (tableau 6 ; Chilliard, 1997). Il est caractérisé par une flaveur particulière et un goût plus relevé que celui du lait de vache, en grande partie due à certains acides gras libres et à la lipolyse du lait (Chilliard, 1997; Jaubert, 1997; Morgan et al, 2001).

Ce goût disparaît après avoir fait bouillir le lait.

#### *Caractéristiques physiques et (bio)chimiques*

Les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre varie de manière importante d'une étude à une autre, car rendant compte de situations locales qui ne peuvent pas être généralisées. Ces laits semblent cependant partager beaucoup de points communs avec le lait de vache. Nous ne mentionnerons ici que les spécificités par rapport au lait de vache qui semblent marquantes d'après la revue de Park et al (2006).

- absence de  $\beta$ -carotène totalement converti en vitamine A
- déficit en acide folique et vitamine B12 (tableau 6)
- des globules gras de plus petite taille que ceux des laits de vache, similaire à celle du lait de brebis, permettant une meilleure homogénéisation dans le lait et ainsi sa meilleure digestibilité, et permettant une lipolyse accrue par augmentation de la surface.
- des micelles de caséine contenant plus de calcium et de phosphate inorganique, moins hydratées, moins stables à la chaleur, et perdant plus facilement leur  $\beta$ -caséine
- solubilisation plus élevée des caséines à 20 °C, ainsi que du phosphate colloïdal et des caséines au froid, entraînant des rendements moins élevés en fabrication fromagère
- déficit en agglutinine, qui rendrait difficile son écrémage, surtout à froid
- stabilité plus faible lors du chauffage
- structure plus lâche lors de la coagulation acide (yaourt), donc une fermeté plus basse.
- des taux d'acides gras à courte et moyenne chaîne plus élevés, en particulier deux fois plus d'acide caprique, caproïque et caprylique associé au goût « chèvre »
- rapport acide laurique sur acide caprique unique (12/10), plus bas (0.46 vs 1.16).
- des taux plus bas d'acide orotique et plus élevés d'éthers glycerol
- sensibilité plus élevée à la lipolyse spontanée due à des différences de localisation de la lipase
- taux de cholestérol plus bas (11/14 mg/100g)

- la  $\beta$ -caséine est la caséine majeure avec 58 % des caséines ( $\alpha$ S1 avec 38 % dans le lait de vache), suivie par la  $\kappa$ -caséine (tableau 4) La quasi-absence de l' $\alpha$ S1-caséine fait que les sujets allergiques uniquement à cette protéine supportent souvent le lait de chèvre.
- taux d'azote non protéique plus élevé (8.7 % vs 5.2 %)
- quantités d'enzymes différentes (exemples : ribonucléase, phosphatase, xanthine oxydase, lipase)
- plus de calcium, potassium, phosphore, magnésium et chlore ; moins de sodium et de sulfure.

#### Caractéristiques nutritionnelles/santé

D'après Park, (2006), le lait de chèvre joue un rôle éminent dans l'alimentation infantile dans de nombreux pays, en particulier les pays méditerranéens et du Moyen-Orient. En particulier, le lait de chèvre est consommé dans les régions où il n'est pas concurrencé par le lait de vache, que les populations jugent supérieur. Il est vrai que dans certains de ces pays il est plus facile d'élever des chèvres que des vaches ( Haenlein, 2004 ; Park , 2006).

Le lait de chèvre présente des teneurs intéressantes pour de nombreux nutriments, excepté pour la vitamine B12 et l'acide folique, pour lesquels il est recommandé une supplémentation du lait pour les nourrissons. Il présente des avantages par rapport au lait de vache du fait de sa plus grande digestibilité (en particulier de la matière grasse et des protéines), de sa meilleure capacité tampon (utile en cas d'ulcère de l'estomac), et de la plus grande disponibilité de ses nutriments (exemple : le fer). Il est ainsi recommandé en médecine et nutrition humaine (Park et al, 2006).

Des études ont montré que d'une manière générale le lait de chèvre est moins allergisant que le lait de vache. La consommation de lait de chèvre au lieu de lait de vache a réduit de 30 à 40 % le nombre d'enfants allergiques d'après la plupart des études (Haenlein, 2004). Il y a un besoin de recherches médicales robustes pour valider les nombreux effets bénéfiques décrits pour le lait de chèvre. En particulier, les teneurs particulières du lait de chèvre en acides gras à courte et moyenne chaînes n'ont pas encore fait l'objet d'études, malgré leurs vertus reconnues pour le traitement de nombreuses maladies (Haenlein, 2004). Sur la base des caractéristiques biologiques, nutritionnelles et métaboliques, une revue récente (Lopez-Aliaga et al, 2010) suggère que le lait de chèvre peut être un excellent aliment naturel dans les cas du syndrome de malabsorption causé par la résection de l'intestin.

#### ***I-5 4. Lait de Jument***

D'après Park et al. (2006).

Les données portent essentiellement sur le lait des animaux de trait, même si les races de sport commencent à faire l'objet d'études.

Le lait de jument a une saveur de noix de coco avec un léger goût sucré d'herbe sauvage. Le lait de jument n'est pas un lait très étudié

##### *Caractéristiques physiques et (bio)chimiques*

Le lait de jument contient les mêmes constituants de base que celui de toutes les espèces de mammifères, mais se différencie nettement de celui des autres herbivores domestiques exploités pour leur production laitière (bovin, ovin, caprin) par des teneurs en minéraux, en matière azotée et en lipides plus faibles (tableau 2) et surtout de qualité très différente (tableau 5). C'est un des laits les plus pauvres en matière sèche (tableau 2) (moins de 12 %), ce qui le rend peu apte à la transformation fromagère.

Comme pour le lait de femme, l'énergie provient pour 50% de lactose et 25% des protéines ce qui explique sa valeur énergétique plus faible (480 Kcal en moyenne) que celle des laits humains et d'autres mammifères domestiques riches en lipides.

Près de 90 pour cent des matières azotées sont sous forme de protéines et la composition en acides aminés des protéines totales de ce lait s'écarte en partie de celles des laits des autres espèces. Seulement 50 pourcent de l'azote du lait est sous forme de caséines, alors que ce pourcentage est de l'ordre de 80 pour cent chez la vache, la bufflonne, la chèvre et la brebis. Le lait de jument ne contient que 11 g de caséines en moyenne par litre contre 25 g pour le lait de vache.

Il contient peu de lipides (le tiers de ce que contient le lait de vache). De plus, ses lipides sont moins riches en triglycérides (81 % vs 97 %) et plus riches en phospholipides et acides gras libres que le lait de vache. Enfin, il contient des niveaux particulièrement élevés en acide gras polyinsaturés.

Sa teneur en vitamine C varie selon les auteurs d'un facteur supérieur à 10, ce qui rend les comparaisons difficiles. Il semble que le stade de lactation soit un facteur important de variation.

Son pH est particulièrement élevé (tableau 3).

##### *Caractéristiques nutritionnelles/santé*

L'intérêt porté au lait de jument tient à la fois à son utilisation comme matière première pour la fabrication de boissons fermentées gazeuses, comme le koumis, qui sont des aliments traditionnels en Asie Centrale et dans le Caucase, et à son utilisation comme aliment de remplacement en pédiatrie, en raison des ressemblances de composition existant entre le lait de jument et le lait humain. Ce lait, consommé frais ou fermenté, a des propriétés diététiques et peut-être thérapeutiques intéressantes, qui connaissent un regain d'intérêt, en

particulier en Europe. De tous les laits d'animaux domestiques, le lait de jument, de par sa composition chimique, en particulier sa teneur élevée en lactose, basse en azote et son ratio caséine/(protéines solubles) bas, est celui qui se rapproche le plus du lait de femme; à ce titre, il a été employé comme substitut du lait de femme. Il est aussi prescrit pour traiter certaines pathologies humaines, sur la foi de pratiques ancestrales plus que sur celles d'expérimentations scientifiques.

Ses principales qualités citées sont sa richesse en nutriments essentiels, acides gras poly insaturés et vitamine C, sa pauvreté en matière grasse (tableau 2), et sa grande digestibilité (lait albumineux).

**I-5 5. Lait de chamelle à une bosse** D'après El-Agamy (2006) et Al Hadj et Al Kanhal (2010)

C'est un liquide blanc, doux, légèrement âpre, qui peut avoir un goût salé ou amer avec certains types d'alimentation des chameaux.

#### Caractéristiques physiques et (bio)chimiques

Le chameau est par excellence un animal adapté aux conditions de sécheresse et la composition du lait de chamelle reflète les conditions de vie de l'animal.

Globalement, sa composition est relativement proche de celle du lait de vache.

Cependant, il présente un certains nombres de particularités :

- ses micelles de caséines ont des tailles variables, avec des micelles plus grosses que celles de vache, brebis, chèvre et buffle, à cause du faible taux en  $\kappa$ -caséine, ce qui augmente le temps de coagulation et rend le coagulum moins ferme
- l' $\alpha$ -lactalbumine et la beta-caséine sont les protéines majeures des caséines et du sérum, respectivement (tableau 4).
- La  $\beta$ -lactoglobuline est absente (tableau 4)
- sa  $\kappa$ -caséine ne présente pas le même site de coupure pour la chymosine bovine que celle du lait de vache, ce qui rend l'emploi de chymosine bovine inopérant en fabrication fromagère. Seule la pepsine contenue dans la présure bovine assure la coagulation. La chymosine cameline, par contre, est active.
- Les systèmes protecteurs lysozyme, lactoferrine et immunoglobulines sont en quantités supérieures à, et plus thermotolérantes que, celles des laits de vache, brebis et chèvre ; le lysozyme a une action sur *S. typhimurium* et pas d'action sur *Lc. lactis*, au contraire du lysozyme de lait de vache.
- Il s'acidifie spontanément moins vite que le lait de vache à température ambiante; trois causes sont proposées : la présence des quantités plus importantes d'agents antimicrobiens, et/ou un taux plus bas de microflore acidifiante indigène, et/ou la présence signalée d'un inhibiteur potentiel de protéases.

- Des globules gras de taille inférieure à celles des laits de vache, brebis, chèvre, conduisant à un mauvais écrémage
- Les acides gras à courte chaîne ( $C_4$ - $C_{12}$ ) sont en plus faible quantité que dans les laits de vache, et surtout de chèvre et de mouton, conduisant à des températures de fusion et de solidification plus élevées de la matière grasse (42 °C et 30,5 % vs 33 °C et 23 °C pour le lait de vache) et à des températures de 20 °-25 °C au lieu de 8 °C-12 °C pour baratter le beurre. Les acides gras insaturés et  $C_{16:1}$  sont, par contre, en plus forte quantité
- son contenu en minéraux est proche de celui du lait de vache (table 5), sauf pour le citrate (128 mg/100 ml vs 160 mg/100ml pour le lait de vache)
- il se distingue du lait de vache par des teneurs élevées en vitamine B<sub>3</sub> et vitamine C (tableau 6), similaire à celles du lait de brebis.
- son pH est bas comparé à celui des laits de vache, brebis et chèvre (table 3).

#### Caractéristiques nutritionnelles/santé

Le lait est le plus souvent consommé frais ou fermenté, et parfois transformé en beurre, fromage et lait pasteurisé.

Il a une place importante dans l'alimentation des populations nomades des zones arides et semi-arides. Le lait de chamelle est réputé avoir des vertus thérapeutiques pour les maux de ventre, les diarrhées, les désordres hépatiques, le diabète juvénile (présence d'une protéine ressemblant à l'insuline détectée dans le lait de chamelle), etc.

**Tableau 3 : Caractéristiques physiques (valeurs moyennes) des laits de quatre espèces de mammifères** [<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm>], avec énergie du lait de jument de Park et al. (2006); pH du lait de jument de El-Agamy (2006); lait de chamelle de El-Agamy (2006); et index tampon et moyenne pH de El-Agamy, (2006)]; avec, par composé, valeurs les plus élevées **en gras**, les moins élevées *en italiques*

Caractéristiques	Espèces			
	Vache(jument)	Chamelle	Chèvre	Brebis
Energie (kcal/litre)	705 (480)	665	600-750	<b>1 100</b>
Densité du lait entier à 20 °C	1,028-1,033	<b>1,025-1,038</b>	<b>1,027-1,035</b>	<b>1,034-1,039</b>
Point de congélation (°C)	-0,520--0,550	<b>-0,580</b>	-0,550-- <b>0,583</b>	-0,570
pH-20°C	6,60-6,80 <u>6,68*</u> ( <b>7.01</b> )	6,20-6,82 <u>6.55*</u>	6.45-6,60 <u>6.70*</u>	6,50-6,85 <u>6.79*</u>
Acidité titrable (g/kg)	1,5-1,7	1,5	1,4-1,8	<b>2,2-2,5</b>
Tension superficielle du lait entier à 15 °C(dynes cm)	50	-	<b>52</b>	45-49
Conductivité électrique à 25 °C (siemens)	45 x 10 <sup>-4</sup>	46 x 10 <sup>-4</sup>	43- <b>56 x 10<sup>-4</sup></b>	38 x 10 <sup>-4</sup>
Indice de réfraction	<b>1,45-1,46</b>	-	1,35-1,46	1,33-1,40
Viscosité du lait entier à 20 °C (centiPas)	2,0-2,2	2,2-2,35	1,8-1,9	<b>2,86-3,93</b>
index tampon max pH 5;2 min	0.034 0,006	<b>0,060-0,062</b> <b>0,011-0,012</b>	0,043 0,006	0,049 0,007

Note: Le signe «-» signifie que les données font défaut ou sont sujettes à caution. \* , pH moyen

**Tableau 4 : Composition moyenne en g/litre et distribution des protéines dans le lait de quatre espèces de mammifères** [<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm>, avec données caséines du lait de chèvre de Park (2006); données caséines de jument de Park et al. (2006); et données du lait de chamelle de Al-Hadj et Al Khanhal (2010) et El-Agamy (2006)] avec, par composé, valeurs les plus élevées **en gras**, les moins élevées *en italiques*

Protéines (g/l)	Espèces				
	Vache	Jument	Chèvre	Brebis	Chamelle
$\alpha$ -lactalbumine	1,5 (25%)	2,30 (26%)	2,0(25%)	1,3 (10%)	> <b>5,0</b>
$\beta$ -lactoglobuline	2,7 (45%)	5,30 (59%)	4,4 (55%)	<b>8,4 (67%)</b>	<i>absente</i>
Albumine sérique	0,3 (5%)	0,20 (2%)	<b>0,6 (7%)</b>	0,6 (5%)	-
Immunoglobulines	0,7 (12%)	1,10 (13%)	0,5 (6%)	<b>2,3 (18%)</b>	-
Protéose-peptone	0,8 (13%)	-	0,6 (7%)	-	-
Total des protéines solubles (100%)	6,0 (100%)	9,00 (100%)	8,10 (100%)	<b>12,6 (100%)</b>	6,3-8,0 (100%)
Caséine $\alpha$ S	12,0 (46%)	(46,6 %)	(25,8 %)	<b>21,0 (47%)</b>	(31,5 %)
Caséine $\beta$	9,0 (36%)	(45,6 %)	<b>(54.8 %)</b>	16,1 (36%)	<b>(65 %)</b>
Caséine $\kappa$	3,5 (13%)	(7.7 %)	<b>(20.4 %)</b>	4,5 (10%)	3,5 %
Caséine $\gamma$	1,5 (6%)	(3.1 %)	-	<b>3,0 (6%)</b>	-
Total des caséines (100%)	26,0 (100%)	10,7 (100%)	15,8-26,0 (100%)	<b>44,6 (100%)</b>	16,3-27,6 (100 %)
Protides totaux	32,0	22,60	34,1	<b>57,2</b>	32,0

-, valeurs absentes

**Tableau 5: Teneurs en minéraux (g/litre) des laits de cinq espèces de mammifères** (<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm>, avec valeurs moyennes fer, cuivre et manganèse du lait de brebis de Haenlein et Wendorff (2006); pour les valeurs du lait de chamelle de El Agamy (2006) et Al Hadj (2010)] avec, par composé, valeurs les plus élevées **en gras**, les moins élevées *en italiques*

<b>Minéraux (mg/litre)</b>	<b>Vache</b>	<b>Chamelle</b>	<b>Jument</b>	<b>Chèvre</b>	<b>Brebis</b>
Sodium (g/kg)	<b>0,50</b>	0,56	<i>0,19</i>	0,37	0,42
Potassium (g/kg)	1,50	1,44	<i>0,68</i>	1,55	1,50
Calcium(g/kg)	1,25	1,29	<i>1,10</i>	1,35	<b>2,0</b>
Magnésium(g/kg)	0,12	0,12	<i>0,085</i>	0,14	<b>0,18</b>
Phosphore (g/kg)	0,95	0,87	<i>0,55</i>	0,92	<b>1,18</b>
Chlore (g/kg)	1,00	1,42	<i>0,30</i>	<b>2,20</b>	1,08*
Fer (mg/kg)	<i>0,20-0,50</i>		0,59	0,55	0,8
Cuivre (mg/kg)	<i>0,10-0,40</i>		0,28	0,40	0,4
Zinc (mg/kg)	3-6	5,3	<i>2,00</i>	5,60	5,7
Manganèse (mg/kg)	<i>0,10-0,30</i>	0,5	0,5	0,32	<i>0,07</i>
Molybdène (mg/kg)	0,070		-	-	-
Aluminium (mg/kg)	0,6-1	-	-	-	-
Iode (mg/kg)	-	-	0,02	-	-

Notes: Les valeurs sont des valeurs moyennes ou dans quelques cas des valeurs extrêmes.

Le signe «-» indique que les données font défaut ou sont sujettes à caution.

\*, valeur El-Agamy, 2006

**Tableau 6 : Teneurs en vitamines des laits (mg/l) de cinq espèces de mammifères** [<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F07.htm>, avec vitamine C du lait de chèvre de Park (2006); vitamines A et C du lait de jument de Park et al (2006); vitamines B et C du lait de chamelle de El-Agamy (2006)] ; avec, par composé, valeurs les plus élevées **en gras**, les moins élevées *en italiques*

Vitamines (mg/l)	Vache	Chamelle	Jument	Chèvre	Brebis
B <sub>1</sub> thiamine	0,42	0.33-0,60	0,28	0,41	<b>0,85</b>
B <sub>2</sub> riboflavine	1,72	0,42-0,80	0,38	1,38	<b>3,30</b>
B <sub>6</sub> piridoxine	<i>0,48</i>	0,52	-	0,60	<b>0,75</b>
B <sub>12</sub> cobalamine	0,0045	0,002	-	<i>0,0008</i>	<b>0,006</b>
B <sub>3</sub> acide nicotinique	0,92	<b>4-6</b>	0,70	3,28	<b>4,28</b>
B <sub>9</sub> acide folique	<b>0,053</b>	<i>0,004</i>	-	<i>0,006</i>	<i>0,006</i>
C	18	<b>24-52</b>	17.2*- <b>145</b>	12.9	<b>47,0</b>
A	0,37	0,37- <b>1,26</b>	0.34	0,24	0,83
β-carotènes	0,21	0,16- <b>0,46</b>	-	<0,10	<i>0,02</i>

Notes: Les valeurs sont des valeurs moyennes ou, dans quelques cas, des valeurs extrêmes.

\* : Park et al 2006

Le signe «-» indique que les données font défaut ou sont sujettes à caution.



# CHAPITRE II

## *Bactéries lactiques*

## II BACTERIES LACTIQUES (LAB)

### II.1 Définition

Les LAB ont été définies d'après leur capacité à produire de l'acide lactique en fermentant les oses. Les LAB, en tant que lactobacillales, sont des bacilles ou coques à Gram positif, non sporulés, habituellement aéro-anaérobies et catalase négative. Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes.

### II.2 Caractéristiques d'intérêt technologique pour les produits laitiers

Toutes les LAB ont un métabolisme fermentaire et sont dépourvues de chaîne respiratoire ayant comme accepteur terminal l'O<sub>2</sub>. Néanmoins, beaucoup sont capables de se servir de l'O<sub>2</sub> (ou de son dérivé l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour réoxyder le NADH (Condon, 1987).

#### ***Production d'acides organiques en grande quantité***

Le catabolisme fermentaire des hexoses conduit chez les LAB à un fort abaissement du pH extracellulaire par la production en grande quantité d'acide lactique et, chez certaines espèces, de CO<sub>2</sub>, ce qui est recherché dans la production des produits alimentaires, en particulier des produits laitiers. Le lait contient des quantités substantielles du diholoside *lactose*, qui, hydrolysé, donnent les deux hexoses *glucose* et *galactose*. La fermentation du galactose est variable selon les espèces et les souches d'une espèce de LAB (exemple : présente chez certaines souches de *Lactococcus lactis*, et absente de toutes les souches de *Streptococcus thermophilus*).

Le catabolisme du lactose s'effectue en trois étapes. (figures 7 et 8) :

- Transport du lactose à travers la membrane cellulaire.
- Hydrolyse du lactose en oses (glucose et galactose)
- Catabolisme des hexoses selon la voie homo- ou hétérofermentaire.

Les oses sont avant tout indispensables aux LAB elles mêmes comme sources d'énergie et de carbone.

Le catabolisme des hexoses se fait par :

- La voie des pentoses-phosphate quand les LAB sont hétérofermentaires strictes (figure 8)

- La voie de la glycolyse ou voie d'Embden Meyerbof Parnas (figure 7) quand les LAB sont homofermentaires strictes ou facultatives. Les LAB homofermentaires facultatives, contrairement aux LAB homofermentaires strictes, sont capables de cataboliser les pentoses

par la voie des pentoses-phosphate ; la fermentation des pentoses est donc hétérolactique, d'où le terme *facultatif*. Par ailleurs, les LAB homofermentaires strictes et facultatives peuvent avoir un métabolisme hétérofermentaire des hexoses dans certaines conditions (exemple : figures 10 et 11). Le métabolisme du pyruvate peut alors conduire aux différents produits indiqués sur la figure 12.

La fermentation des hexoses est dite homolactique si l'acide lactique est le seul composé produit. Les hexoses sont alors dégradés par la voie glycolytique en pyruvate = voie d'Ebden-Meyer hoff-Parnas(EMP) (figure 7).

La fermentation des hexoses est dite hétérofermentaire si, à côté de l'acide lactique, d'autres composés sont aussi produits tels que l'acide acétique, le CO<sub>2</sub>, l'éthanol et l'acide formique. Les hexoses empruntent alors soit la voie des pentoses-phosphate (cas des LAB hétérofermentaires stricts) soit la voie de la glycolyse mais le pyruvate produit n'est pas intégralement transformé en lactate (existence d'autres voies de réoxydation du NADH, cas des LAB homofermentaires strictes ou facultatives).

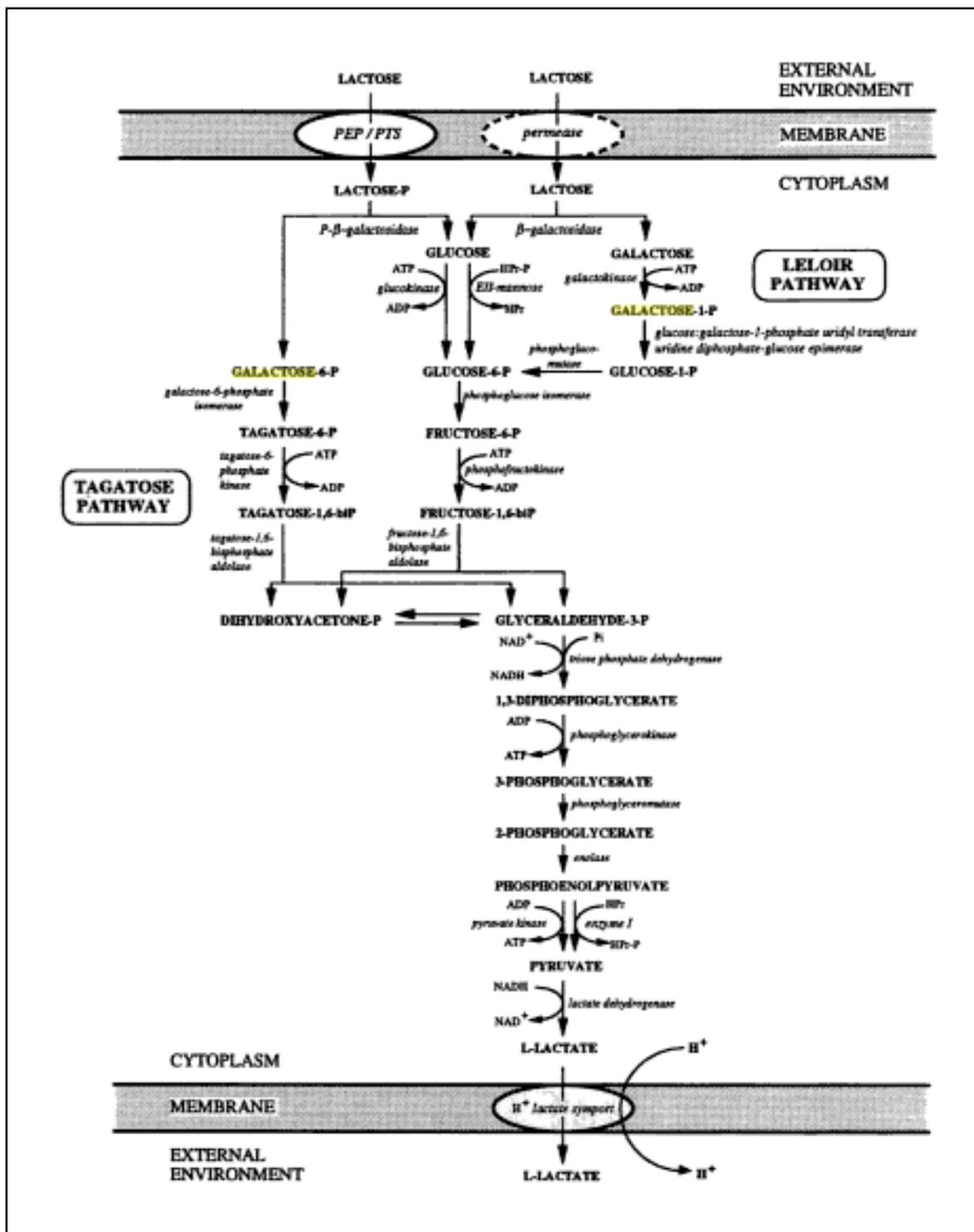


Figure : 7 métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques par la voie homofermentaire de la glycolyse (Fox et al., 2000).

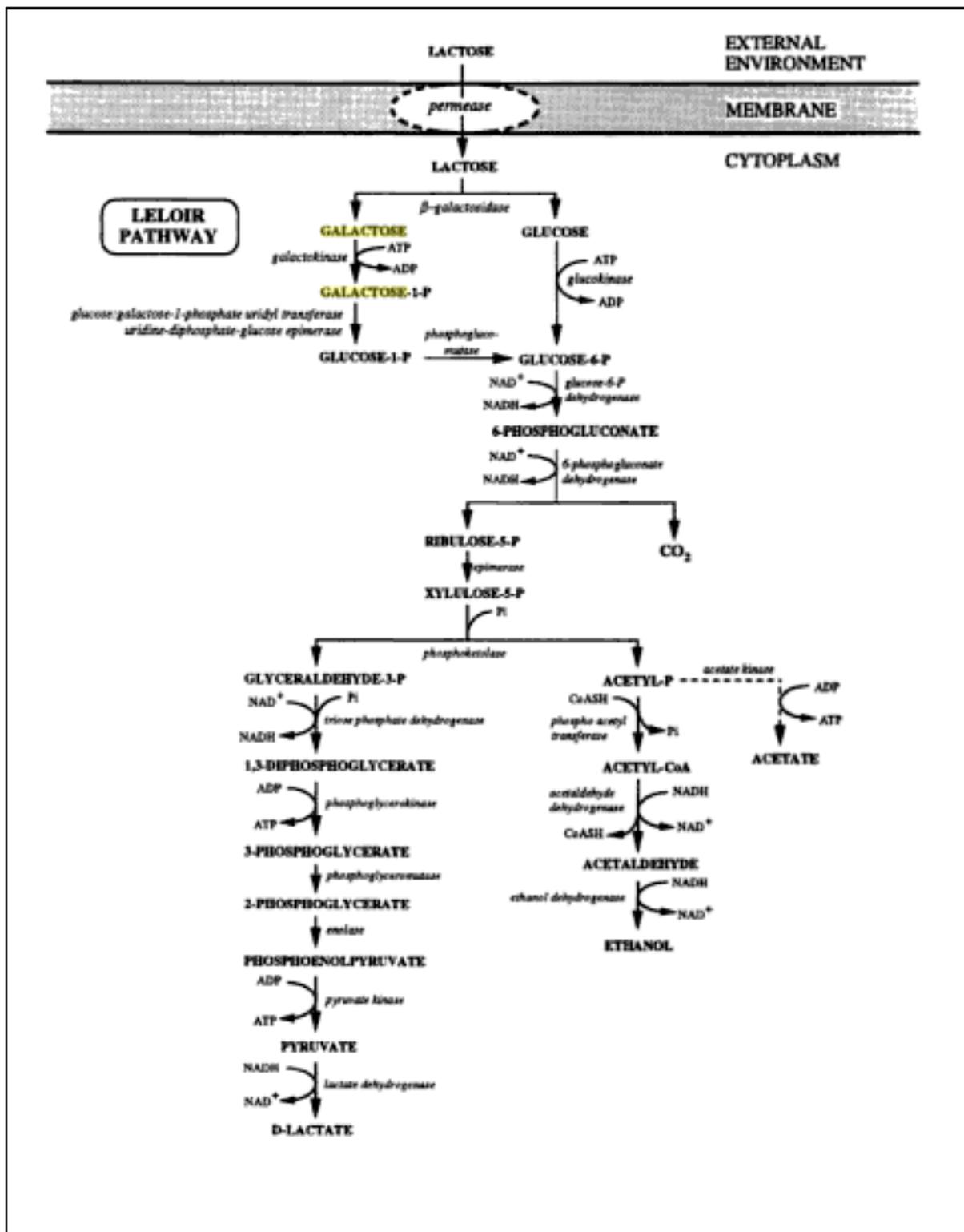
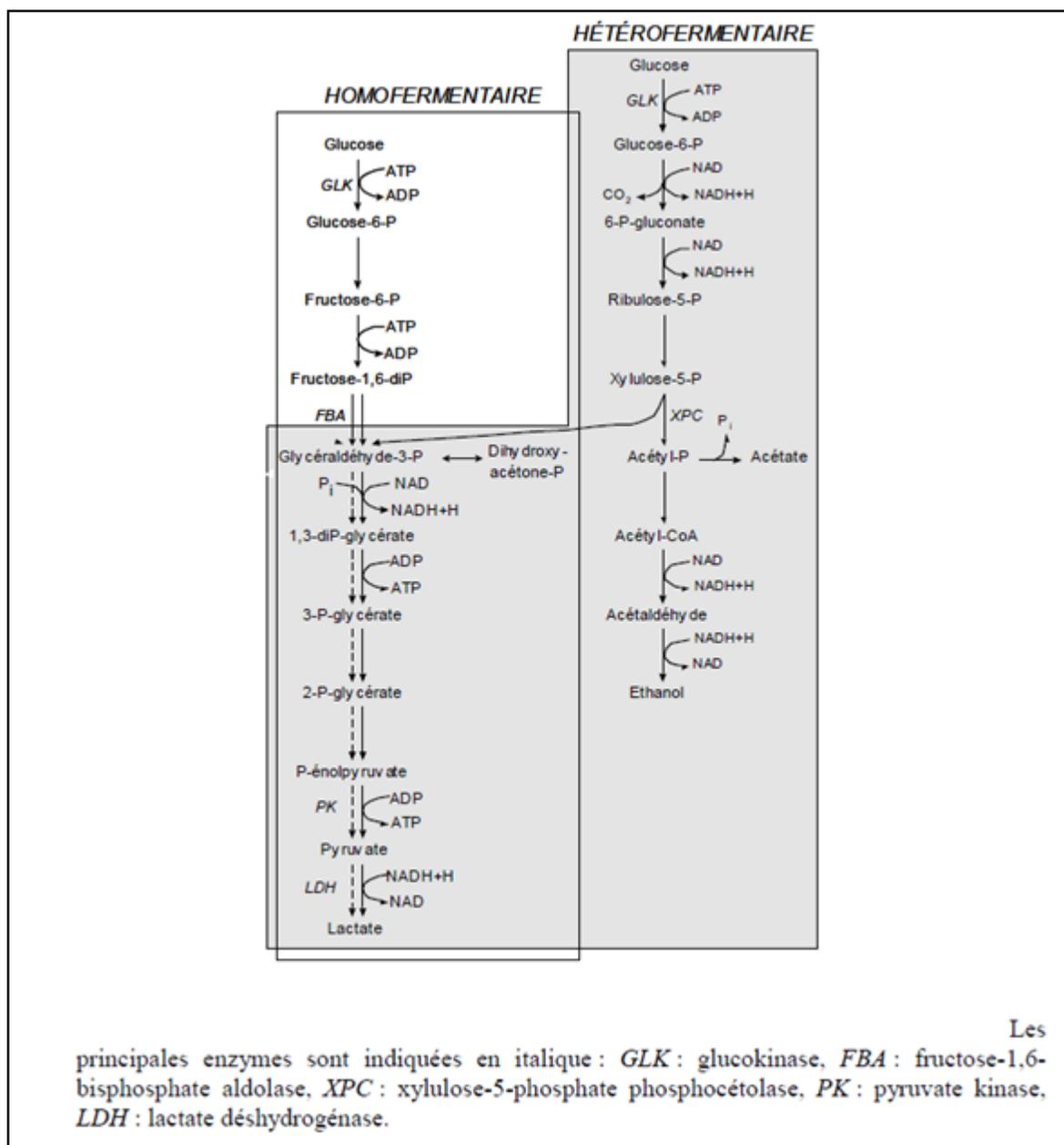
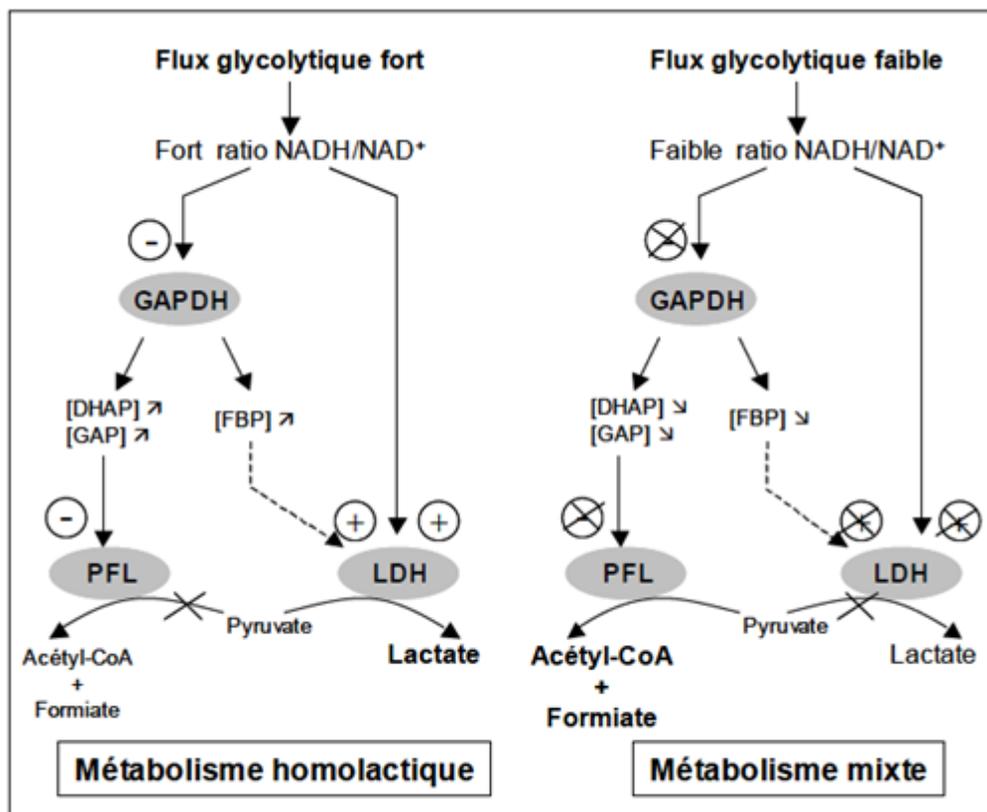


Figure 8 : métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques par la voie hétérofermentaire des pentoses-phosphate (Fox et al., 2000)

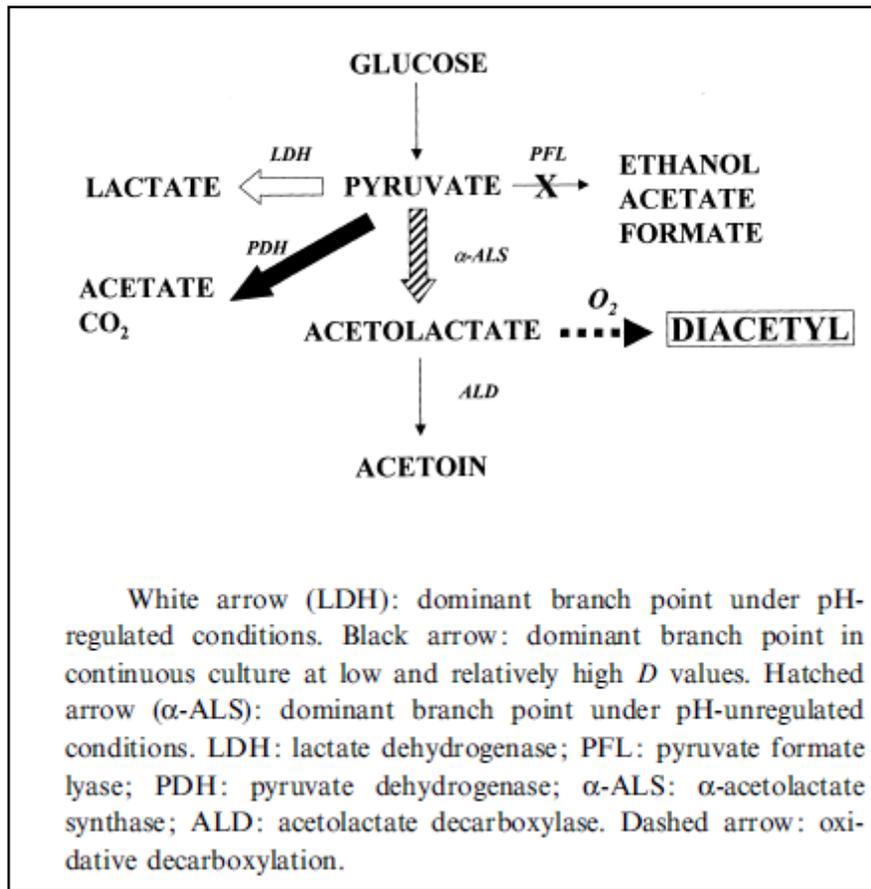


**Figure 9:** Voies homofermentaire/homolactique (glycolyse + LDH, rectangle gauche) et hétérofermentaire/hétérolactique (voie des pentoses-phosphate, fond gris) (Raynaud, 2006)

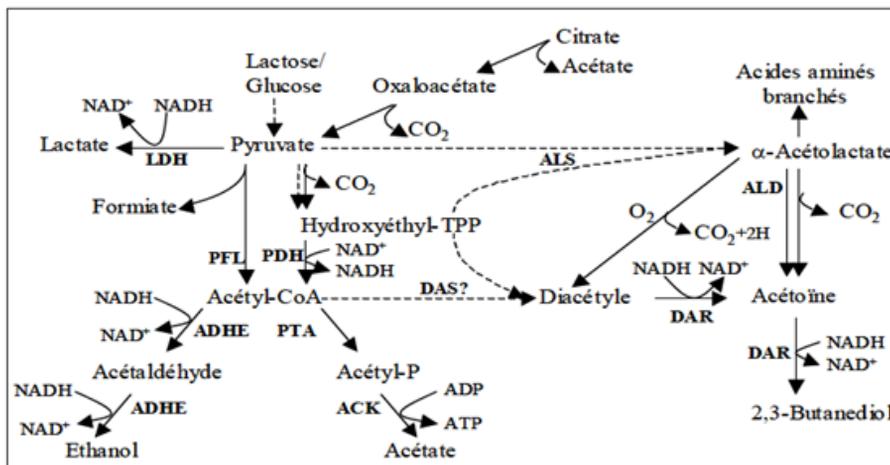
La fermentation des hexoses ne conduit pas aux mêmes produits terminaux selon la voie métabolique utilisée par l'espèce de LAB. Par la voie glycolytique, quatre molécules de lactate peuvent au maximum être produites par molécule de lactose consommée (= il n'existe pas d'autres voies pour réoxyder le NADH), alors que par la voie des pentoses-phosphate deux molécules de lactate, deux molécules d'éthanol et deux molécules de CO<sub>2</sub> peuvent au maximum être produites par molécule de lactose consommée (= il n'existe pas d'autres voies pour réoxyder le NADH).



**Figure 10** : Voie hétérofermentaire facultative des hexoses chez *Lactococcus lactis* (Raynaud, 2006). GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase; PFL: pyruvate formate lyase; LDH: lactate deshydrogénase; FBP, fructose di phosphate, DHAP, dihydroxy-acétone phosphate; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate



**Figure 11** : Voie schématisée de la conversion du pyruvate par *Lc. lactis* en condition aérobie à pH acide (Lopez de Felipe et Hugenholtz, 1999)



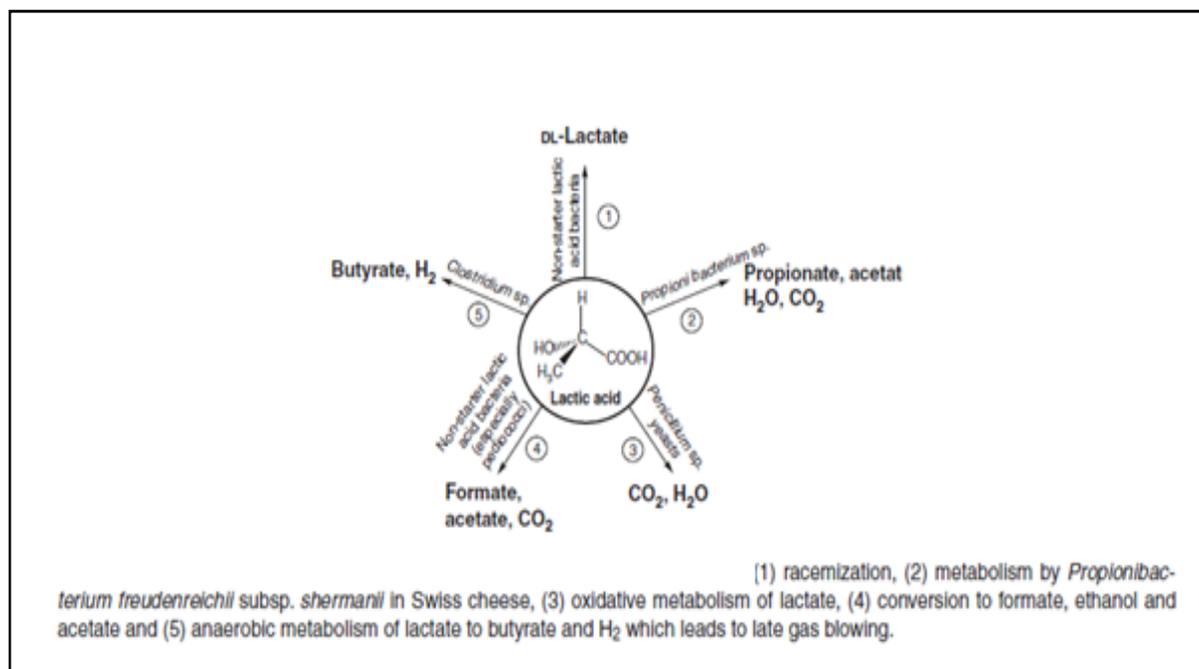
LDH: lactate déshydrogénase, PFL: pyruvate formate lyase, PDH: pyruvate deshydrogénase, PTA: phosphotransacétylase, ACK: acétate kinase, ADHE: alcool deshydrogénase, ALS:  $\alpha$ -acétolactate synthase, ALD:  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase, DAS: diacétyle synthase, DAR: diacétyle-acétoïne réductase.

**Figure 12** : Métabolisme du pyruvate (Raynaud, 2006). Toutes ces enzymes, excepté la LDH, n’existent pas forcément chez toutes souches de LAB

L'accumulation d'acide produit à partir des hexoses conduit à l'acidification des produits fermentés. Cette acidification a lieu dès les premières heures de fabrication.

L'acidification (degré et vitesse) des produits laitiers détermine (a) les caractéristiques texturales du produit fini via la coagulation quand elle se fait par voie acide, le degré de minéralisation du lait et la quantité de chymosine retenue (b) les qualités sanitaires, de conservation et organoleptiques du produit fini en inhibant les bactéries pathogènes ou d'altération et en régulant, via les valeurs de pH, l'activité des autres microorganismes présents et des enzymes non microbiennes.

L'acide lactique produit peut servir de substrat à d'autres microorganismes, levures, et bactéries (figure 13).



**Figure 13** : Métabolisme du lactate dans le fromage en cours d'affinage (McSweeney et Fox, 2004)

### **Protéolyse**

De part leur taille et leur charge, les protéines et les oligopeptides du lait nécessitent la présence de protéases capables d'hydrolyser les protéines natives du lait comme les caséines (protéolyse primaire), et la présence de protéases et peptidases capables d'hydrolyser des peptides issus de la protéolyse primaire (protéolyse secondaire). Le système protéolytique des bactéries lactiques joue un rôle essentiel dans la protéolyse secondaire des produits laitiers.

Dans les produits laitiers, la protéolyse :

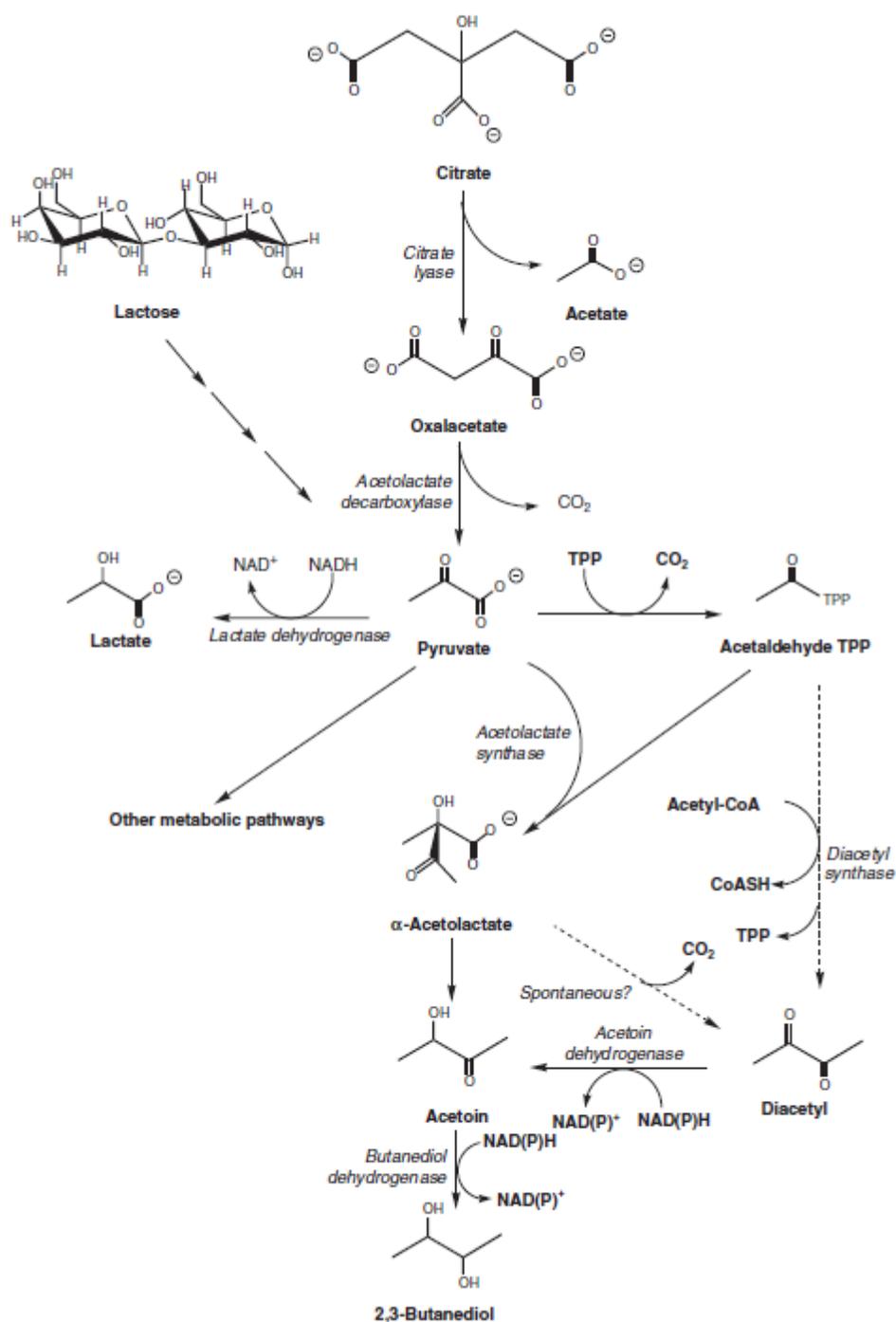
- (a) permet la croissance des bactéries par la fourniture d'azote aminé dont elles ont besoin, Après utilisation des acides aminés et des peptides libres présents en petite quantité dans le lait, les bactéries lactiques doivent hydrolyser les protéines en peptides assimilables (de petite taille) et en acides aminés pour croître dans le lait (exemple : voir lactocoques),

- (b) contribue au développement de la texture (en hydrolysant la matrice protéique, en diminuant l' $a_w$  par fixation de l'eau sur les groupements carboxyles et aminés libérés par l'hydrolyse des ponts peptidiques, et en augmentant indirectement le pH par libération d'ammoniac à partir des acides aminés)(Upadhyay et al, 2004).

- et (c) contribue au développement de la flaveur de ces produits (en libérant des peptides et des acides aminés directement aromatisant, en hydrolysant des peptides amers libérés à partir des caséines, en libérant des acides aminés précurseurs de composés d'arôme, et en facilitant la libération des composés sapides de la matrice lors de la mastication (Upadhyay et al., 2004).

### ***Production de composés liés aux caractéristiques sensorielles***

La fermentation hétérolactique des hexoses par les LAB peut fournir des quantités substantielles de  $\text{CO}_2$  et de précurseurs d'arôme ou de certains composés d'arôme tels que l'éthanol, l'acétaldéhyde, le diacétyl, contribuant à l'élaboration de la texture ( $\text{CO}_2$ ) et de la flaveur des produits fermentés (figures 11 et 12) L'éthanol est un précurseur de composés d'arôme de la classe des esters. La co-fermentation du citrate et des hexoses, réalisée par certaines LAB (McSweeney and Fox, 2004) permet d'augmenter les quantités de ces composés, dans des proportions différentes selon les conditions de culture, oxygénation ou non et hexoses limitant ou non (Hugenholtz, 1993),(Lopez-De Felipe et al, 1997). Le citrate est présent à des concentrations de 4 et 10 mM dans le lait et est tout d'abord transformé en pyruvate (figure 14).



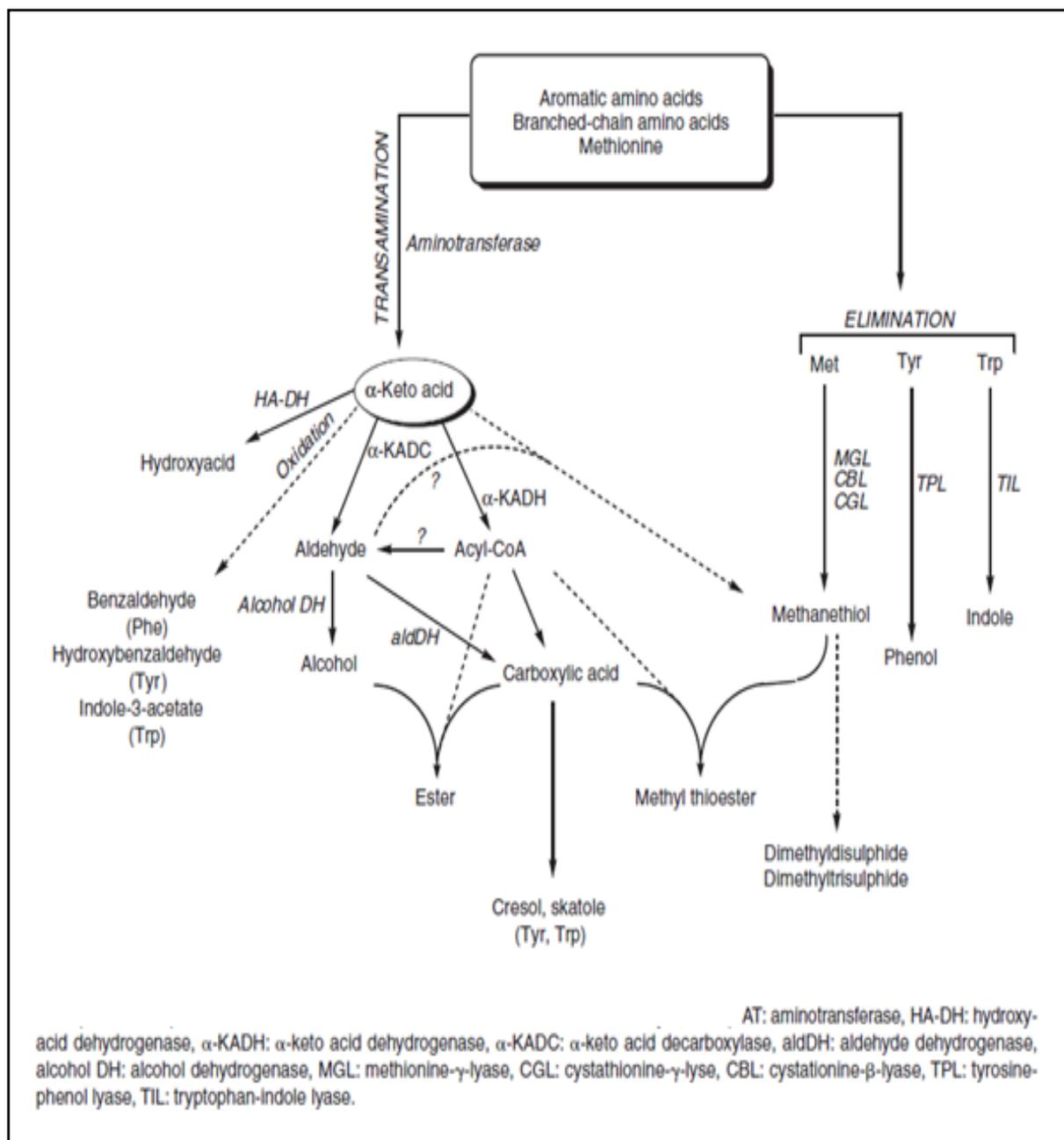
**Figure 14** : Métabolisme du citrate par les souches citrate-positives chez les lactocoques et les entérocoques (Mc Sweeney et Fox, 2004)

La protéolyse, comme indiqué dans le paragraphe protéolyse, peut aussi fournir des quantités substantielles d'acides aminés composés d'arôme en eux-mêmes et précurseurs d'arôme tels que des alcools, des aldéhydes, des esters, et des composés soufrés (tableau 7).

**Tableau 7** : Nom et nature chimique des principaux composés d'arômes principaux dérivés de la méthionine, des acides aminés à chaîne ramifiée et des acides aminés aromatiques (Curtin et McSweeney, 2004).

<i>Amino acid</i>	<i>Aldehydes</i>	<i>Alcohols</i>	<i>Carboxylic acids</i>	<i>Thiols/Misc.</i>
Leucine	3-Methylbutanal/ isovaleraldehyde	3-Methylbutanol	3-Methylbutanoic acid/ isovaleric acid	
Isoleucine	2-Methylbutanal	2-Methylbutanol	2-Methylbutanoic acid	
Valine	2-Methylpropanal/ isobutyraldehyde	2-Methylpropanol	2-Methylpropanoic acid/ isobutyric acid	
Phenylalanine	Phenylacetaldehyde, benzaldehyde	Phenylethanol	Phenylacetic acid	
Tyrosine	OH-phenylacetaldehyde, OH-benzaldehyde	OH-phenylethanol	OH-phenylacetic acid	<i>p</i> -Cresol, phenol
Tryptophan	Indole-3-acetaldehyde,	Tryptophol	Indole-3-acetic acid	Skatole, indole
Methionine	3-Methylthiopropional/methional	3-Methylthiopropanol	3-Methylthiopropionic acid	Methanethiol

Les LAB possèdent, de façon variable selon les souches/espèces/genres, les activités nécessaires à ces catabolismes d'acides aminés (figure 15).

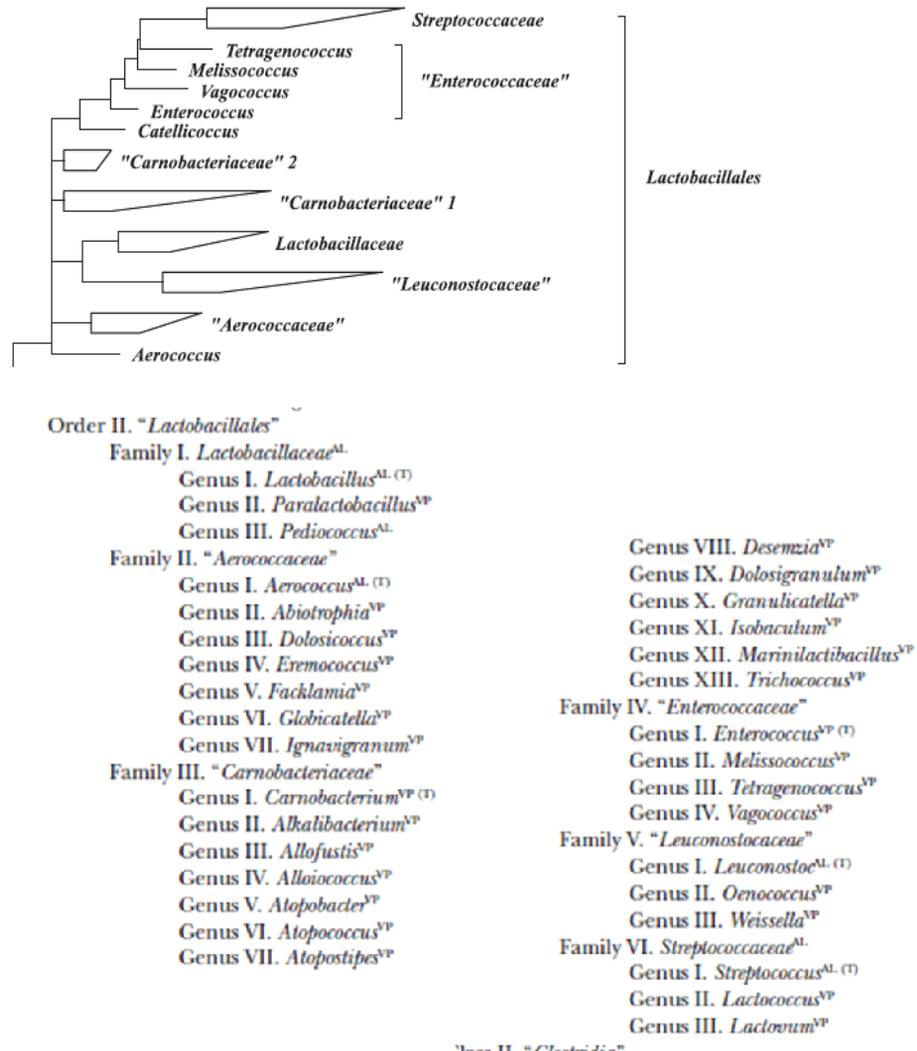


**Figure 15** : Voies du catabolisme des acides aminés chez différents microorganismes et certaines réactions chimiques (lignes pointillées) survenant dans les fromages en cours d’affinage (Curtin et Mc Sweeney, 2004)

### II.3 Taxonomie

<http://www.bergeys.org/outlines.html>

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des firmicutes et à cinq des six familles de l'ordre des lactobacillales (pas la famille II) (figure 16).



**Figure 16** : Taxonomie des bactéries lactiques (Ludwig et al., 2009), basée sur la comparaison des séquences d'ADN 16rDNA

Nous allons maintenant présenter les trois genres de LAB retrouvés parmi les coques isolés lors de ce travail. Les lactocoques ont fait l'objet de nombreux travaux, les leuconostocs et les entérocoques beaucoup moins. Les lactocoques sont toujours l'objet de nombreux travaux, en particulier sur leur métabolisme. Les leuconostocs ne font plus l'objet de travaux. Les entérocoques font encore l'objet de nombreux travaux, en particulier sur leur inocuité, car ils pourraient participer à l'élaboration des caractéristiques sensorielles de produits laitiers, mais ne sont pas reconnus comme GRAS (Generally-Recognized As Safe) (Ogier et Serron, 2008).

### II.4 Genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* a été défini en 1878 par van Tieghem; le mot leuconostoc vient de l'association de *leukos* qui veut dire clair avec *Nostoc* qui est une cyanobactérie, signifiant donc Nostoc incolore. Il appartient à la famille V des lactobacillales aux côtés des genres *Weisella* et *Oenococcus* (figure 16). Les premières souches ont été isolées lors d'accidents apparus dans des raffineries de sucre. Les leuconostocs se présentent sous forme de cellules sphériques immobiles, souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes.

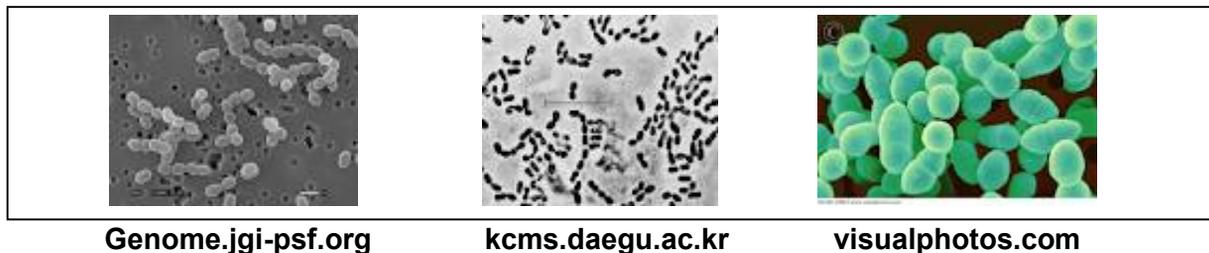


Figure 17 : Images de *Leuconostoc* .....

#### **Habitat et rôle**

Les leuconostocs sont naturellement présents sur les végétaux. On les retrouve dans le lait, sur les végétaux cultivés (en particulier la betterave à sucre d'où leur ancien nom de *Betacoccus*) et, comme bactérie levain ou naturelle, dans de nombreux produits fermentés laitiers, carnés, végétaux (choucroute, olives, ensilage) et de panification (tableau 8).

Tableau 8 : Aliments fermentés qui peuvent contenir les leuconostocs (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004)

Products	Foodstuff	Raw material	Country	Microorganisms
Dairy	Butter and cream	Milk	International	LAB
	Cheeses	Milk	International	LAB, yeasts, mould
	Fermented milks (amasi, maziwa lala, laban, filmjolk, kefir, pindidam, smetanka, etc)	Milk	Europe  Africa Asia	LAB, yeasts
Meat	Sausages	Meat	Europe Southeast Asia	LAB, yeasts, moulds
	Salami	Meat	Europe	LAB
Fish	Sauce foods (belacham, chinchaluk, pekasam, som-fak, etc)	Fish, schrimp	Southeast Asia	LAB
Cereal	Beverages (beer, boza, bushera, idli, dadih, jangsu, ogi, pozol, sobia, etc)	Malt, maize, corn, rice, millet	International	LAB, yeasts, moulds
	Dough and starchy accompaniments (bread, flour, mawe, puto, trahanas, etc)	Maize, rice, sorghum, tef	Europe, Africa, Southeast Asia	LAB, yeasts
	Sauce foods (tsauco, etc)	Rice, soybeans	Southeast Asia	LAB
Vegetable	Sauerkraut	Cabbage	International	LAB
	Pickles, kimchi, sayur-asin	Olives, beetroot, cabbage, carrot, cucumber, sweet-pepper	International	LAB
	Dough and starchy accompaniments (agbelima, flour, fufu, sapal, etc)	Cassava, taro	Africa,  New Guinea South America	LAB
	Cocoa		Central Africa	Yeast, acetic acid bacteria, LAB
	Coffee		South America Central Africa	LAB, yeasts, Enterobacteriaceae,
Fruit	Juices		South America International	LAB
	Tempoyak	Durian fruit	South East Asia	LAB
	Kocho	Ensete ventricososa	Africa	LAB

<sup>a</sup>Compiled from Arunga (1992), Buckenhuskes (1993), Thunell (1995), Caplice and Fitzgerald, 1999, Steinkraus (2002), Avallone, Guyot, Brillouet, Olguin, and Guiraud (2001), Mogensen et al. (2002), Hansen (2002), Bjorkroth and Holzapfel (2003).

On les retrouve en particulier dans de nombreux laits fermentés et de nombreux fromages fabriqués à partir de lait cru de vache, brebis ou chèvre (Devoyod et Poullain, 1988).

Leur métabolisme gazogène est responsable de l'ouverture de certaines variétés de fromages, par exemple les fromages à pâte persillée. Ils ont été associés à des défauts de présentation, gonflement, de certaines variétés de fromages (Devoyod et Poullain, 1988). Leur métabolisme du citrate et des oses participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de diacétyl et de CO<sub>2</sub>, en inhibant les bactéries psychrotrophes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages (Vedamuthu, 1994). Ils provoquent des altérations dans les boissons sucrées et les sirops, mais ils ne sont ni hémolytiques ni pathogènes. Les leuconostocs, cités parfois comme des pathogènes opportunistes chez l'homme, sont cependant reconnus comme inoffensifs et peuvent donc être utilisés pour fermenter des produits laitiers (Ogier et Serror, 2008).

Leur utilisation a décliné au niveau mondial du fait de la désuétude des beurres maturés dans les pays développés et de l'abandon de l'association entre lactocoques/leuconostoc, nécessaire pour profiter des fonctions des leuconostocs, au profit de l'utilisation de *Lc lactis* biovar *diacetylactis*, qui remplit avec une seule souche les mêmes fonctions que l'association. Cependant Vedamuthu (1994) souligne que *Lc. lactis* ne remplit pas aussi bien les rôles d'acidification et d'aromatisation que certaines associations +lactocoques/leuconostocs dans la production de beurre fermentés.

### **Caractéristiques physiologiques et métaboliques**

Les leuconostocs sont généralement mésophiles, avec une température optimale de croissance de 25 - 30°C ; (Garvie, 1967), et anaérobies facultatifs ; Cependant, l'espèce *L. carnosum*, isolée de viandes fraîches lors de leur conservation, est une bactérie anaérobie ayant une température optimale de croissance de 2°C.

Ils ne produisent pas d'ammoniac à partir d'arginine, et sont hétérofermentaires stricts, produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et parfois même de l'acétate (figure 17). Leur pouvoir protéolytique est nul. Ils sont intrinsèquement résistants à la vancomycine (Hodwitz et al, 1987; Dyas et Chauhan, 1988).

Ils sont exigeants du point de vue nutritionnel (acides aminés et vitamines). En particulier, les leuconostocs laitiers nécessitent pour leur développement les trois acides aminés branchés et la glutamine (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004), ainsi que les vitamines acide nicotinique, biotine, thiamine et acide pantothénique (Garvie, 1967). Seule, l'espèce *Lc. lactis* est capable d'acidifier le lait ; au contraire, l'espèce *L. mesenteroides*

n'acidifie le lait que très lentement (Garvie, 1960) ou en présence d'extrait de levures (Sandine et al, 1962).

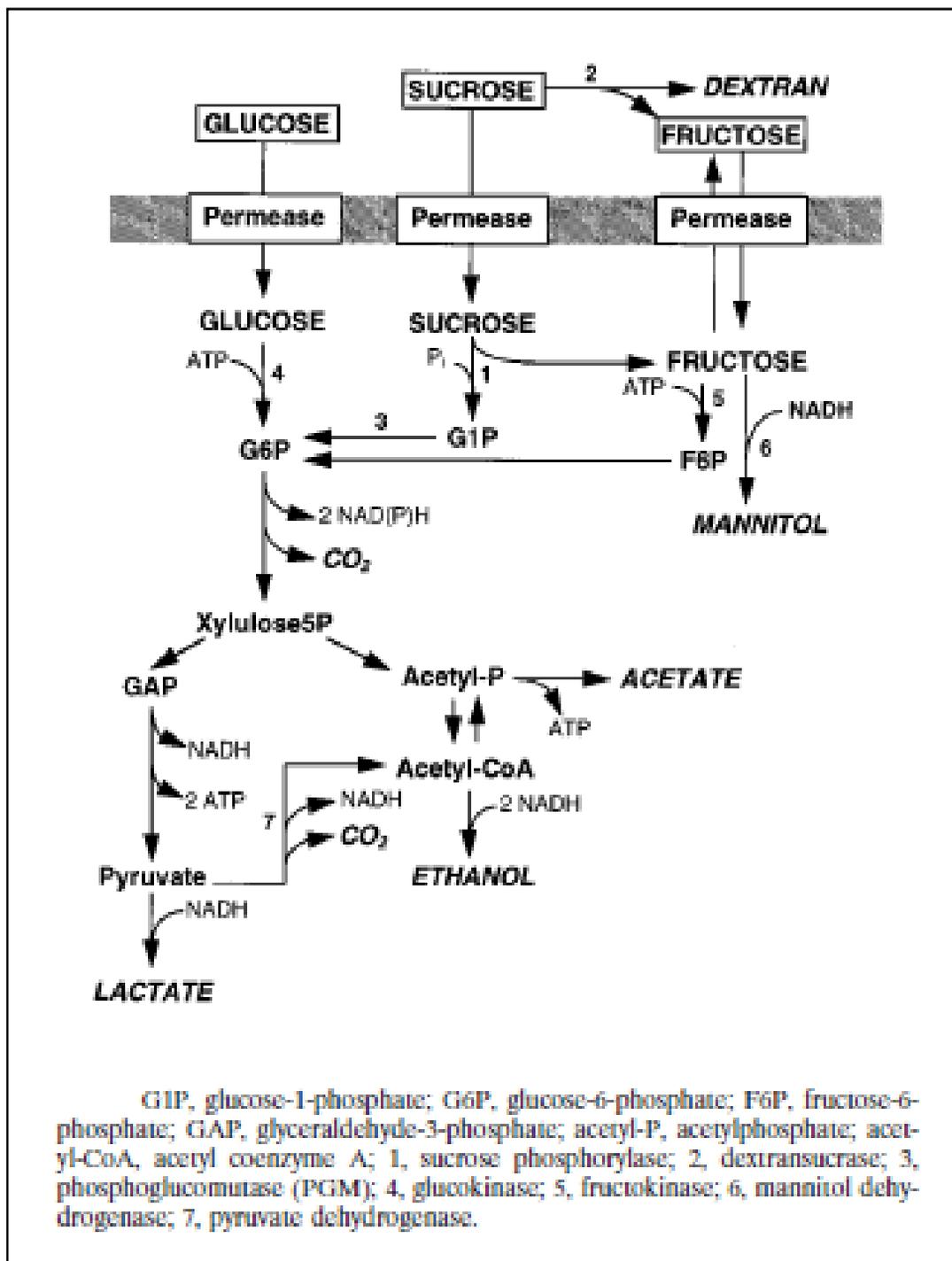
Dans le lait, *L. mesenteroides* fonctionnent obligatoirement en association avec les lactocoques, qui initient leur croissance (Vedamuthu, 1994). En association, les lactocoques acidifient et les leuconostocs produisent des composés volatils à partir du citrate. Les lactocoques peuvent donc apporter aux leuconostocs des nutriments qui manquent à ces derniers dans le lait. A noter que cette association bénéfique a été décrite au profit de quelques souches de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* seulement parmi plusieurs testées (Vedamuthu, 1994). Ainsi, les leuconostocs servent peu à acidifier, mais sont complémentaires des lactocoques pour les caractéristiques sensorielles du produit laitier fini (ouverture et flaveur). Par exemple, Keenan et al., 1966, *L. citrovorum* s'appelle actuellement *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* et les streptocoques lactiques (qui sont des lactocoques) ont montré l'importance des interactions lactocoques /leuconostocs et du maintien d'un certain rapport entre les leuconostocs et les lactocoques pour que les leuconostocs puissent exprimer pleinement leur métabolisme lors de la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol.

*L. mesenteroides* subsp. *cremoris* est utilisé comme levain pour le beurre, la crème et les fromages frais, mais n'a aucun intérêt pour les autres fromages car il ne peut pas s'y maintenir et s'y développer (Hemme et Foucaud-Scheneumann, 2004); dans les fromages, il est préférable d'ensemencer au moins  $10^7$  cellules de *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ou *mesenteroides* / ml de lait, ou  $10^6$  cellules/ ml de lait puis de faire maturer le lait pendant 15 h à 13 °C (Hemme et Foucaud-Scheneumann, 2004). Même ainsi et en présence de lactocoques, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ou *mesenteroides* ne se multiplient pas ou peu dans le lait puis le caillé.

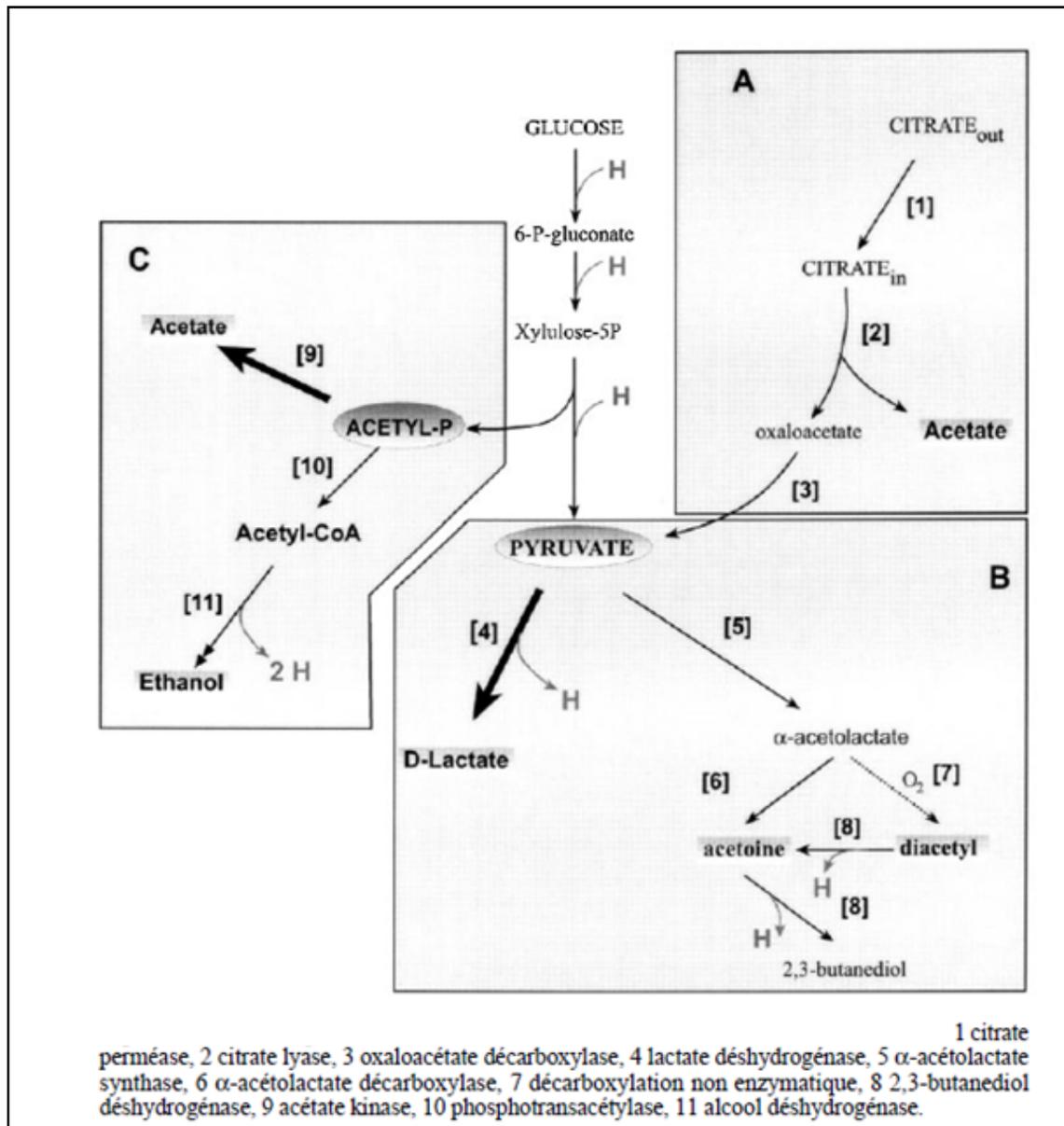
Par ailleurs, les leuconostocs laitiers ont besoin de traces de manganèse pour avoir une croissance et une production de composés de flaveur correcte (Vedamuthu, 1994).

Les leuconostocs possèdent un métabolisme de l'O<sub>2</sub>, revue par Hemme et Foucaud-Scheneumann (2004) qui leur permet de se développer plus vite, d'atteindre une biomasse plus importante et de réduire les quantités d'éthanol produites au profit de celles d'acétate.

Les leuconostocs produisent des composés d'arôme à partir du métabolisme des hexoses et du citrate (éthanol, CO<sub>2</sub>, acétaldéhyde, diacétyl donnant le goût de beurre) avec des équilibres différents selon les conditions (présence d'O<sub>2</sub>, etc.) (figure19). De l'équilibre entre les différents composés d'arôme dépend l'apparition ou non de défauts de flaveur et d'une production excessive de gaz (Vedamuthu, 1994). L'excès d'acétaldéhyde est par exemple responsable du défaut de « vert ».



**Figure 18** : Représentation schématique du flux de carbone et énergie dans les voies centrales du métabolisme de divers oses par *L. mesenteroides* (Dols et al., 1997)



**Figure 19** : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* (Bourel et al, 2001)

Certains leuconostocs (c'est le cas de *L. mesenteroide* subsp. *mesenteroides* et subsp *dextranicum*) produisent du dextrane à partir de saccharose (figure 19). Cette propriété est utilisée pour les isoler et les caractériser. Elle n'a aucun intérêt pour les produits laitiers.

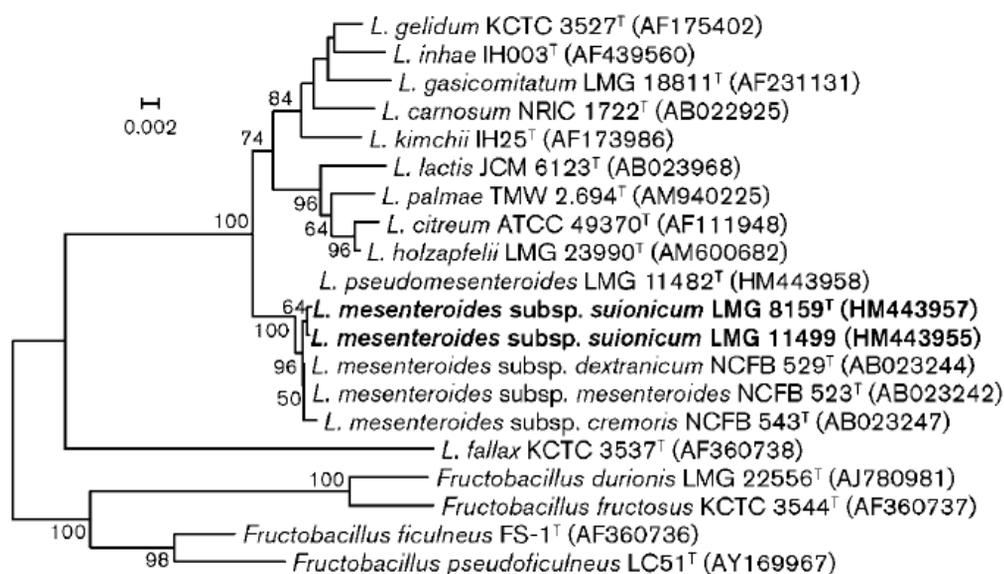
**Taxonomie :**

Ce genre regroupe actuellement 13 espèces, dont l'espèce *Leuconostoc.mesenteroides* (cf. liste sur figure 20 à laquelle il faut ajouter une espèce récemment décrite par Lee et al, (2012).

*Leuconostoc.mesenteroides* est la seule espèce à posséder des sous-espèces, au nombre de 4 actuellement : *Leuconostoc.mesenteroides subsp cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*.

et *Leuconostoc mesenteroides subsp suionicum*, proposée et décrite en 2012.

Cette nouvelle sous-espèce se distingue en particulier des autres sous-espèces par son empreinte génétique avec les amorces (GTG)<sub>5</sub> (Gu et al, 2012).



**Figure 20** : Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de leuconostocs selon leur séquence 16S rDNA (Gu et al, 2012)

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *L. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *L. citreum* (Cibik et al, 2000).

**Isolement et identification des leuconostocs laitiers**

Il n'existe aucun milieu sélectif. On utilise communément la capacité à consommer le citrate, ou la capacité à résister à la vancomycine (milieu MRS + vancomycine (Mathot et al, 1994) ou la capacité à produire du dextrane à partir de saccharose (milieu MSE; Mayeux et al, 1962). Par exemple, *L. lactis* et *L. mesenteroides subsp. cremoris* n'en produisent pas.

**Tableau 9:** Principaux phénotypes différenciant le genre *Leuconostoc* d'autres bactéries lactiques (Bergey's Manual, 2009). Les espèces *L. palmae*, *L. miyukkimchii* et *L. holzapfelii* manquent. Au contraire, les espèces *L. argentinum*, *L. fructosum*, *L. durionis* et *L. ficulneum* n'existent plus.

GENUS I. LEUCONOSTOC							
Characteristic	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	Homofermentative		Heterofermentative		
			ovoid-shaped LAB ( <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> )	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Pediococcus</i>
Morphology	Ovoid to short rods (pairs and chains)	Ovoid or rods (pairs and chains)	Ovoid (pairs and chains)	Rods	Rods	Rods	Round cocci (tetrads and pairs)
CO <sub>2</sub> from glucose	+	+	-	-	+	- (+)	-
Hydrolysis of arginine	-	+ or -	- or +	+ or -	- or +	+	- or +
Dextran from sucrose	-/+	-/+	- or +	- or +	- or +	-	-
Lactic acid isomer from glucose	D(-)	D(-) or DL	L(+)	D(-), DL, or L(+)	DL	L(+)	DL or L(+)
Peptidoglycan <sup>b</sup>	LysAla/Ser	LysAla/Ser <sup>c</sup>	Lys-Asp	Mainly Lys-Asp and m-A2pm	Lys-Asp and others <sup>d</sup>	m-A2pm	Lys-Asp

<sup>a</sup>Symbols: +, positive reaction; -, negative reaction; +/-, mostly positive; -/+, mostly negative.

<sup>b</sup>Abbreviations: Lys, lysine; Ala, alanine; Ser, serine; Asp, aspartate; m-A2pm, 2,6-diaminopimelic acid (2,6-diaminoheptanedioic acid).

<sup>c</sup>No Lys-Asp-types, but differentiations of Lys-Ala/Ser types, with the exception of *Weissella kandleri*.

<sup>d</sup>Related to those of *Leuconostoc* and *Weissella*.

**Tableau 10** : Caractères phénotypiques différenciant les espèces de leuconostocs (Bergey's Manual, 2009). Entre temps, *L. paramesenteroides* a été reclassifié et n'est plus un leuconostoc

Characteristic	<i>mesenteroides</i>	<i>dextranica</i>	<i>caprovis</i>	<i>L. argentinum</i>	<i>L. cathosium</i>	<i>L. citreum</i>	<i>L. duntonis</i>	<i>L. fallax</i>
Cell morphology	Cocoid to elongated cocci	Rods in pairs or chains	Cocoid to elongated cocci					
<i>Acid from:</i>								
Amygdalin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
Arabinose	+	-	-	d	-	+	-	-
Arbutin	d	-	-	-	-	+	-	-
Cellulose	d	d	-	ND	ND	ND	ND	ND
Cellobiose	d	-	-	d	d	d	-	-
Fructose	+	+	-	d	+	+	+	+
Galactose	+	d	+	+	-	-	-	-
Lactose	d	+	d	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	+	-	+	-	+
Mannitol	d	-	-	d	-	d	+	(d)
Mannose	d	d	-	+	d	+	-	+
Melibiose	d	d	-	+	d	-	-	-
Raffinose	d	d	-	+	-	-	-	-
Ribose	d	+	-	-	d	-	+	+
Salicin	d	-	-	-	d	+	-	-
Sucrose	+	+	-	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	-	d	+	+	+	(d)
Xylose	d	d	-	d	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactic acid configuration	D	D	D	D	D	D	D	D
Hydrolysis of esculin	+	+	-	-	d	+	-	ND
Dextran production	+	+	-	-	+	ND	ND	ND
Growth at pH 4.8	-	-	-	ND	ND	ND	+	+
Requirement of TjF	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 10% ethanol	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
NAD-dependent G6PDH present	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
Growth at 37 °C	d	+	-	+	-	d	+	+
Peptidoglycan type	Lys-Ser-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ser-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ser-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	ND	Lys-Ala <sub>2</sub>

Suite								
<i>L. fallax</i>	<i>L. fechtneum</i>	<i>L. fructosum</i>	<i>L. gasicomitatum</i>	<i>L. gelidum</i>	<i>L. inhae</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. pseudomesenteroides</i>
Coccoid to elongated cocci	Short rods	Short rods	Coccoid to elongated cocci	Coccoid to elongated cocci	Coccoid to elongated cocci	Coccoid or ovoid	Coccoid to elongated cocci	Coccoid to elongated cocci
ND	ND	ND	-	ND	d	+	ND	ND
-	-	-	+	+	d	+	-	d
-	ND	ND	-	+	-	ND	-	d
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
-	-	-	+	+	+	+	-	d
+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	d	-	d	+	+	d
-	-	-	-	-	-	+	+	d
+	-	-	+	d	+	+	+	+
(d)	+	+	-	-	+	+	-	-
+	-	-	+	+	+	+	d	+
-	-	-	+	+	-	-	d	d
-	-	-	+	+	-	+	d	d
+	-	-	+	d	ND	+	-	+
-	ND	ND	-	+	d	+	d	d
+	(+)	-	+	+	+	+	+	d
(d)	+	-	+	+	+	+	-	+
-	-	-	-	+	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	D	D	D	D	D	D	D	D
ND	-	-	+	+	+	ND	-	d
ND	+	-	+	+	d	+	-	ND
+	-	ND	ND	ND	+	ND	-	ND
-	-	-	-	-	-	-	-	-
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
ND	ND	ND	ND	MD	ND	ND	+	ND
+	-	+	-	-	-	+	+	+
Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ala <sub>2</sub>	ND	ND	Lys-Ala <sub>2</sub>	Lys-Ser-Ala <sub>2</sub>

<sup>1</sup>+, 90% or more of strains positive; -, 90% or more of strains negative; d, 11-98% of strains positive; (+), delayed reaction; ND, no data. D, 90% or more of the lactic acid is D(-).

<sup>2</sup>Data for *Leuconostoc mesenteroides* are from Garvie (1986), for *Leuconostoc agrippinum* from Dicks et al. (1993), for *Leuconostoc carnosum* from Shaw and Harding (1989) for *Leuconostoc citrum* from Farrow et al. (1989) and Schillinger et al. (1989), for *Leuconostoc danovis* from Leisner et al. (2005), for *Leuconostoc fallax* from Martinez-Murcia and Collins (1991) and Barrington et al. (2002), for *Leuconostoc fructosum* and *Leuconostoc fructosum* from Antunes et al. (2002), for *Leuconostoc gasicomitatum* from Björkroth et al. (2000), for *Leuconostoc gelidum* from Shaw and Harding (1989), for *Leuconostoc inhae* from Kim et al. (2003), for *Leuconostoc kimchii* from Kim et al. (2003b), for *Leuconostoc lactis* from Garvie (1986), and for *Leuconostoc pseudomesenteroides* from Farrow et al. (1989). The peptidoglycan type of *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidum*, and *Leuconostoc agrippinum* was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig, Germany.

**Tableau 11** : Caractères phénotypiques différenciant certaines espèces de leuconostocs (Farrow et al., 1989). Entre temps, *L. paramesenteroides* a été reclassifié et n'est plus un leuconostoc.

Characteristic	<i>Leuconostoc citreum</i> (n = 11) <sup>a</sup>	<i>Leuconostoc lactis</i> (n = 4)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (n = 30)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (n = 14)	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> (n = 3)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (n = 7)
Acid produced from <sup>b</sup> :						
L-Arabinose	91 <sup>c</sup>	25	83	0	100	71
Ribose	0	0	84	28	100	100
D-Xylose	18	0	96	29	0	100
D-Galactose	18	100	87	86	100	86
D-Fructose	100	100	100	43	100	100
D-Mannose	100	100	100	43	100	100
D-Mannitol	55	0	18 (97) <sup>d</sup>	7 (14)	0 (100)	0 (14)
α-Methyl-D-glucoside	100	0	94	21	100	86
Amygdalin	82	0	60	0	0	29
Arbutin	91	0	66	0	0	14
Esculin	100	0	97	7	33	57
Salicin	91	0	93	0	33	43
Cellobiose	91	0	73	0	33	71
Maltose	100	100	100	21	100	100
Lactose	0	100	53	65	0	58
Melibiose	9	75	97	29	100	86
Sucrose	100	100	100	50	100	71
Trehalose	100	50	100	43	100	100
Raffinose	0	75	77	21	33	86
Starch	0	0	0	0	0	14 (76)
β-Gentiobiose	91	0	70	7	33	58
D-Turanose	100	0	87	7	100	71
Gluconate	91	0	57	7	100	57
2-Keto-gluconate	45 (63)	0	3	0	33	14 (43)
5-Keto-gluconate	0	0	0 (12)	0	0	14 (43)
Lemon yellow pigment <sup>e</sup>	91	0	7	14	0	14

<sup>a</sup> n is the number of strains tested.  
<sup>b</sup> Tests were performed by using the API 50CH system; readings were determined at 48 h.  
<sup>c</sup> Percentage of strains positive.  
<sup>d</sup> Values in parentheses refer to readings at 7 days.  
<sup>e</sup> Pigment detected in centrifuged cell pellet from MRS broth.

Si l'isolement a été fait sur MRS + vancomycin, il est très difficile de distinguer, par des méthodes phénotypiques simples, les leuconostocs des lactobacilles hétérofermentaires stricts, qui peuvent être confondus par examen microscopique (Garvie, 1986). Le seul critère clairement distinctif reste le type d'isomère de l'acide lactique produit (tableau 9), qui doit être mis en évidence dans un surnageant de culture par un dosage enzymatique coûteux.

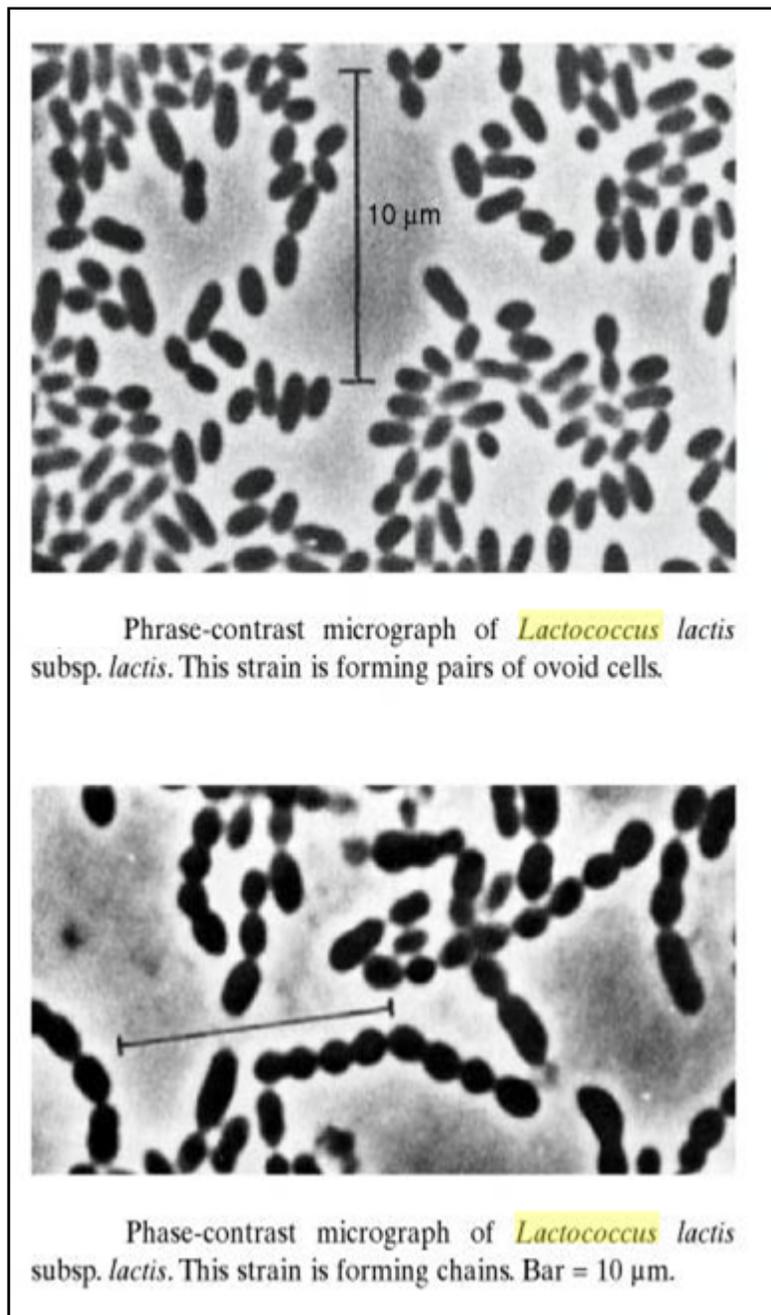
Il est aussi impossible de distinguer entre elles les espèces *L. mesenteroides*, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides* et *L. lactis* d'après les phénotypes classiquement recherchés (tableau 10), les profils phénotypiques variant souvent d'une souche à l'autre d'une même espèce. Les espèces *L. mesenteroides* et *L. pseudomesenteroides* sont les plus difficiles à différencier (tableau 11). La tolérance à 6.5 % de NaCl est présente chez *L. mesenteroides* et absente chez *L. pseudomesenteroides*. Difficile à mettre en œuvre (incubation prolongée nécessaire, lecture délicate), la résistance au sel conduit à des erreurs d'identification (Ogier et al., 2008).

Une identification des isolats basée sur l'amplification de séquences d'ADN spécifiques a été proposée dans les années 2000 (Cibik et al., 2000, Lee et al., 2000). Depuis, la spécificité des amorces n'a malheureusement pas été réévaluée par rapport aux nouvelles espèces de leuconostocs décrites, ce qui rend l'utilisation de ces amorces non fiables sans réexamen de leur spécificité.

## II.5 Genre *Lactococcus*

### **Morphologie**

Les lactocoques se présentent sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de 0,5 à 1µm de diamètre formant des chaînes de longueur variable (figure 21).



**Figure 21** : *Lactococcus lactis subsp lactis* sous forme de cellules ovoïdes par paire (photo du haut), et en chaînette (photo du bas) selon la souche (Teuber et Geis, 2006)

**Habitat et rôle**

Les lactocoques sont trouvés sur les végétaux et dans les produits laitiers (tableau 12).

Les lactocoques se trouvent en grande quantité dans le lait cru et une large gamme de produits laitiers tels que le beurre et les laits fermentés, et de nombreuses variétés de fromages (soit parce qu'ils y ont été ajoutés comme levains (tableau 13), soit parce que les produits laitiers ont été fabriqués à partir de lait cru à des températures favorables au développement des lactocoques. Les végétaux sont le réservoir naturel des lactocoques laitiers. Les lactocoques laitiers utilisés depuis longtemps dans les levains ont perdu certains phénotypes et acquis d'autres phénotypes suite à la domestication de lactocoques issus de végétaux (Bachmann et al., 2012).

Les lactocoques isolés de végétaux ont, par exemple, la capacité à fermenter une plus large variété de glucides et à produire plus de composés d'arôme, une autotrophie pour un nombre d'acides aminés supérieur, et une plus forte tolérance aux stress (Nomura et al., 2006; Tanous et al., 2006; Rademaker et al., 2007; Siezen et al., 2007).

**Tableau 12** : Espèces de lactocoques isolées de produits laitiers et de l'environnement des exploitations agricoles (Teuber et Geis, 2006)

Sample	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. garviae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	New, undefined <i>Lactococcus</i> sp.
<b>Cheese plant</b>					
- cheese milk	+	+			
- cheese whey	+	+			
- waste whey	+	+	(+)		
- wastewater tank	+	+	+	+	+
- wastewater disposal site soil	(+)	(+)		(+)	
- grass	(+)	(+)	(+)	(+)	
<b>Farm samples</b>					
- raw milk	+	+	+	+	+
- milk machine	+	+			
- udder	+	+			
- Saliva, cow	(+)	(+)			
- Saliva, bull	(+)				
- skin, cow	(+)		(+)		
- skin, bull	(+)		(+)		
- grass		(+)		(+)	
- soil	(+)		(+)	(+)	
- silage	(+)				

+ = detected by direct plating; (+) = detected by plating after enrichment.

**Tableau 13** : Lactocoques dans des levains destinés à la fermentation des produits laitiers (Teuber et Geis, 2006)

Type of product	Composition of starter culture
1. Cheese type without eye formation (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 to 98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2 to 5%
2. Cottage cheese, quarg, fermented milks, cheese types with few or small eyes (e.g., Edam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%; or <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85 to 90%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%
3. Cultured butter, fermented milk, buttermilk, cheese types with round eyes (e.g., Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70 to 75%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. "diacetylactis," 15 to 20%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2 to 5%
4. Taette (Scandinavian ropy milk)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
5. Viili (Finnish ropy milk)	<i>Oidium lactis</i> (covers surface); <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
6. Casein	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
7. Kefir	Kefir grains containing lactose-fermenting yeasts (e.g., <i>Candida kefir</i> ), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefirifaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

\*The quantitative composition has been taken from the culture catalog of a major worldwide supplier.

Dans le domaine laitier, les lactocoques sont directement impliqués dès les premières étapes dans le processus de transformation de produits laitiers variés tels que le beurre, les laits fermentés et de nombreux fromages; ils sont toujours présents dans les levains acidifiants mésophiles, en association ou non avec des leuconostocs et des streptocoques thermophiles. Certaines activités non identifiées permettent aux leuconostocs de se multiplier (Hemme et Foucaud-Scheuneman, 2004).

Ils jouent un rôle essentiel dans l'élaboration des caractéristiques de nombreux produits fermentés, en particulier les produits laitiers, de part leurs activités métaboliques variées : production/consommation d'acides et de bases, protéolyse des caséines, biosynthèse de composés d'arôme (cf. LAB §II-2), et réduction du potentiel redox. Le potentiel redox affecte de nombreuses caractéristiques des produits laitiers en agissant sur la croissance et les activités des microflore utiles, d'altération et pathogènes, ainsi que sur la production et la stabilité de composés d'arôme l'O<sub>2</sub>, une des composantes du potentiel redox, peut en outre être responsable de la coloration brune de certains fromages (Tachon et al., 2010).

### **Caractéristiques physiologiques et métaboliques**

Les lactocoques sont des bactéries mésophiles homofermentaires (figure 22) produisant la forme L du lactate. Leur température optimale de croissance est de 30 °C. Le lactate peut constituer 90% des produits de fermentation du lactose. A côté du lactate, le pyruvate peut conduire à la production de quantités importantes d'autres métabolites (figure 23) dans certaines conditions de culture ou chez certains mutants. Pour leur croissance, les lactocoques ont généralement besoin d'un apport en certains acides aminés (Ayad .1999) tels que l'acide glutamique, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la valine, et la méthionine (Cocaign-Bousquet et al., 1995).

Chez *Lc. lactis*, la croissance sur lait est diauxique; les deux phases exponentielles sont séparées par une phase pendant laquelle sont synthétisées les protéases de paroi. Pendant la première phase exponentielle, *Lc. lactis* consomme les acides aminés et les peptides présents dans le lait. Pendant la seconde phase exponentielle, *Lc. lactis* consomme les caséines. La capacité à utiliser les caséines (quantité de protéase synthétisée et vitesse d'hydrolyse des caséines) limite le taux de croissance bactérien (Bruinenberg et al, 1992; Helinck et al, 1997).

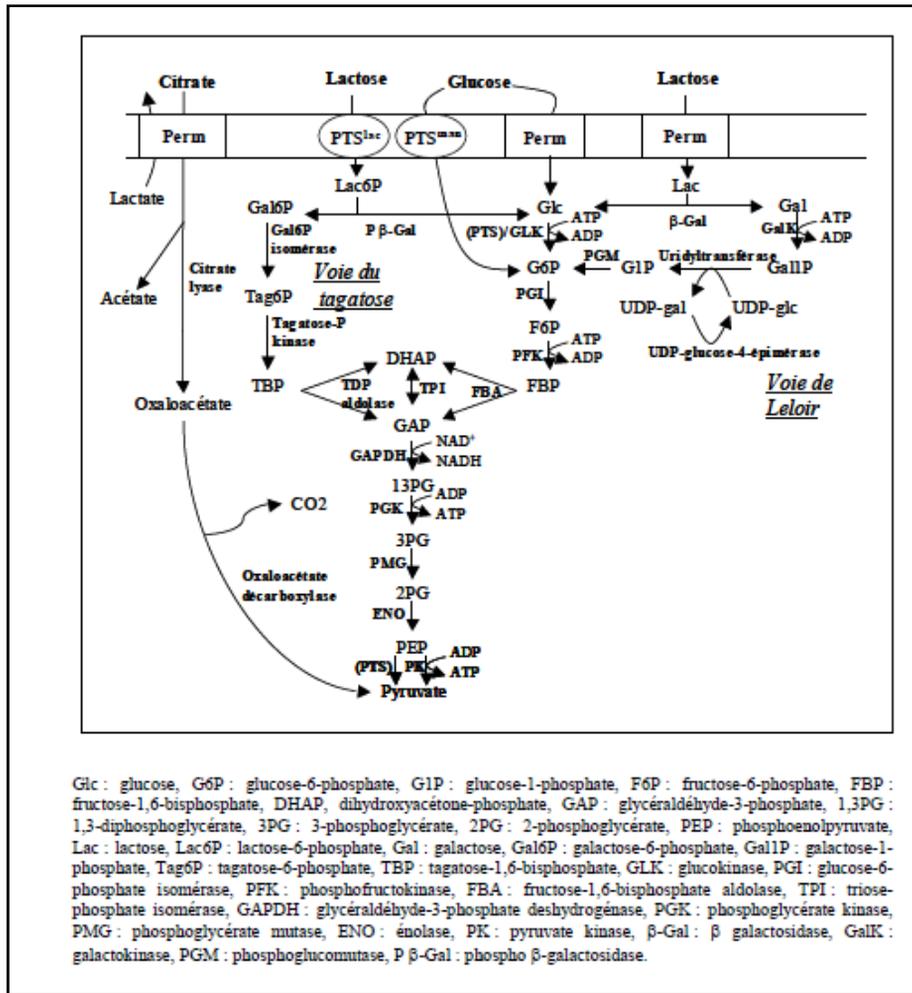


Figure 22 : Métabolisme du glucose, du lactose et du citrate par *Lc. lactis* en amont du pyruvate (Raynaud, 2006)

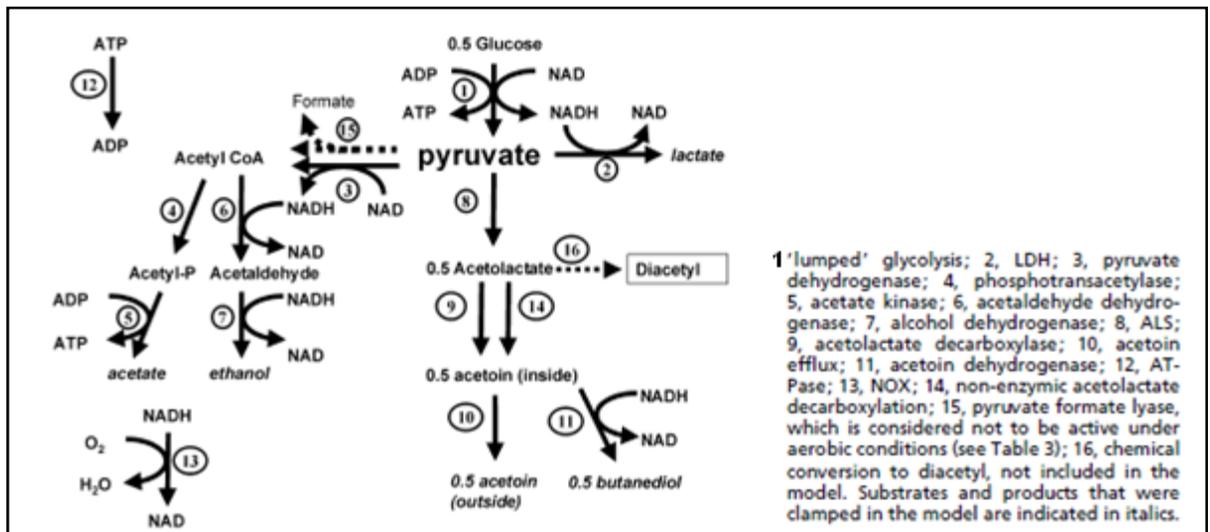
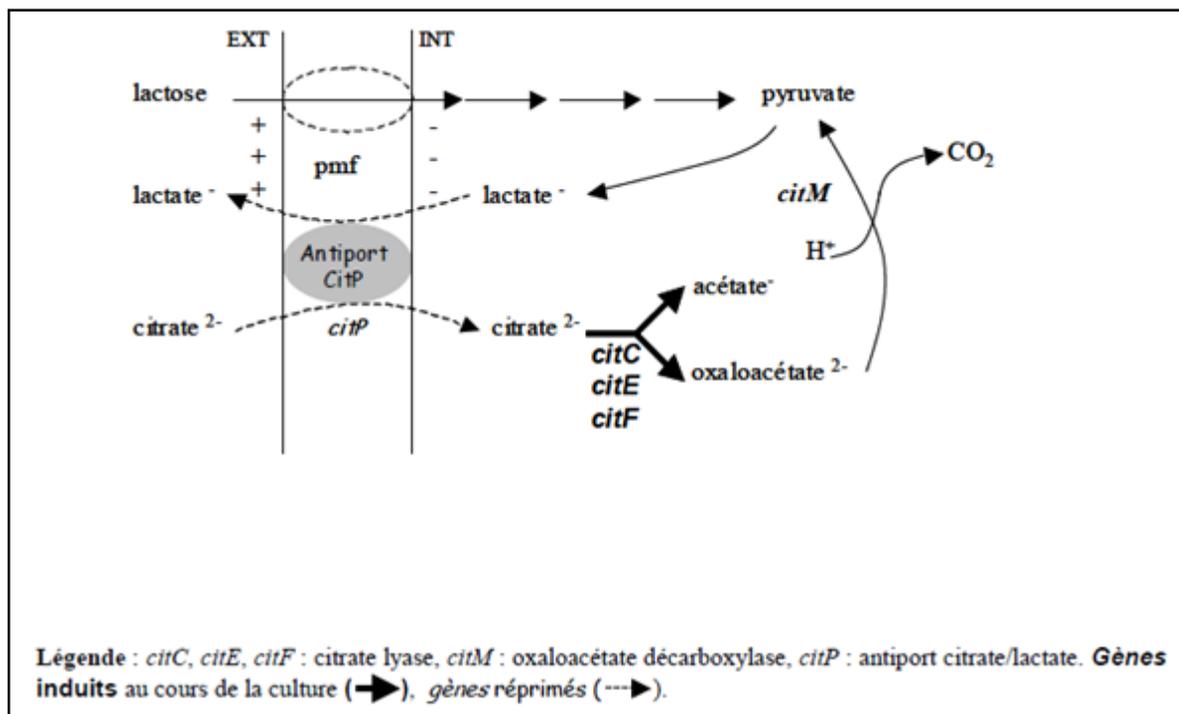


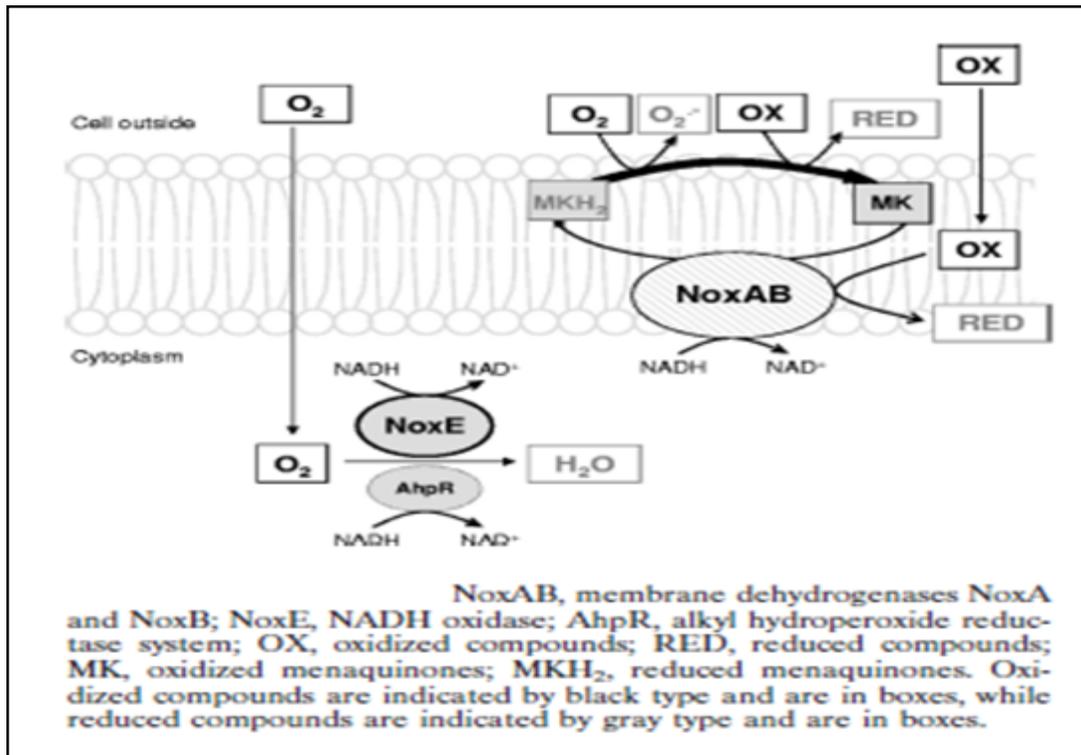
Figure 23 : Distribution des atomes de carbone dans les métabolites dérivés du pyruvate chez *Lc. lactis* (Hofnagel et al., 2002)

L'utilisation du citrate par *Lc lactis* est liée à la présence d'un plasmide de 7,9 kb portant l'information nécessaire au transport du citrate à l'intérieur de la cellule (Kempeler et McKay, 1979). Elle permet à la cellule de lutter contre l'acidification du cytoplasme (figure 24).



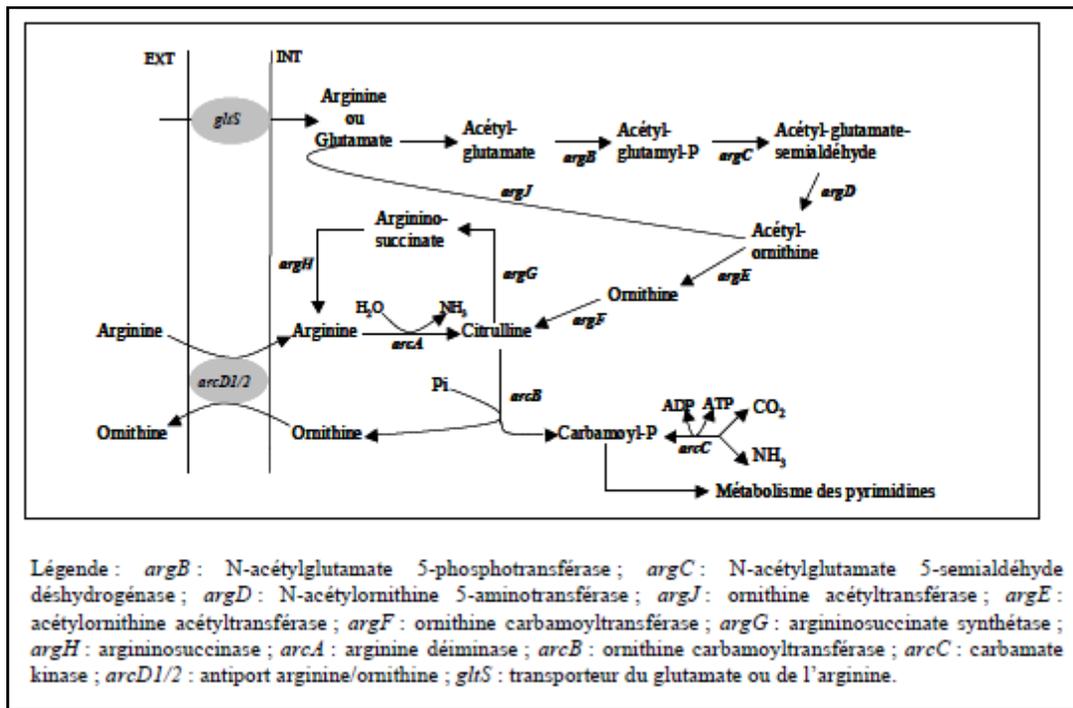
**Figure 24 :** Cycle du TCA et lutte contre l'acidification du cytoplasme (Raynaud, 2006)

Pour réoxyder le NADH issu du catabolisme des oses, *Lc lactis* est capable, à côté de la réduction du pyruvate, d'utiliser l' $O_2$  indépendamment d'une chaîne respiratoire, puis d'autres accepteurs d'électrons de nature inconnue couplés à une chaîne de transport d'électrons, abaissant ainsi le potentiel d'oxydo-réduction du lait à des valeurs négatives (figure 25).



**Figure 25** : Représentation schématique du mécanisme de réduction du lait *par Lc. lactis* (Tachon et al., 2009)

Après consommation du lactose, certains lactocoques, dont *Lc lactis* subsp. *lactis*, peuvent dégrader l'arginine (tableau 13) par la voie de l'arginine désaminase (figure 26). C'est une voie énergétique et permettant de lutter contre l'acidification du cytoplasme. Cette voie permet de produire une molécule d'ATP par molécule d'arginine consommée et de produire de l'ammoniac. Cette voie est formée de trois enzymes agissant successivement : l'arginine désaminase(AD), l'ornithine carbamoyl-transferase(OCT) et la carbamate kinase(CK)

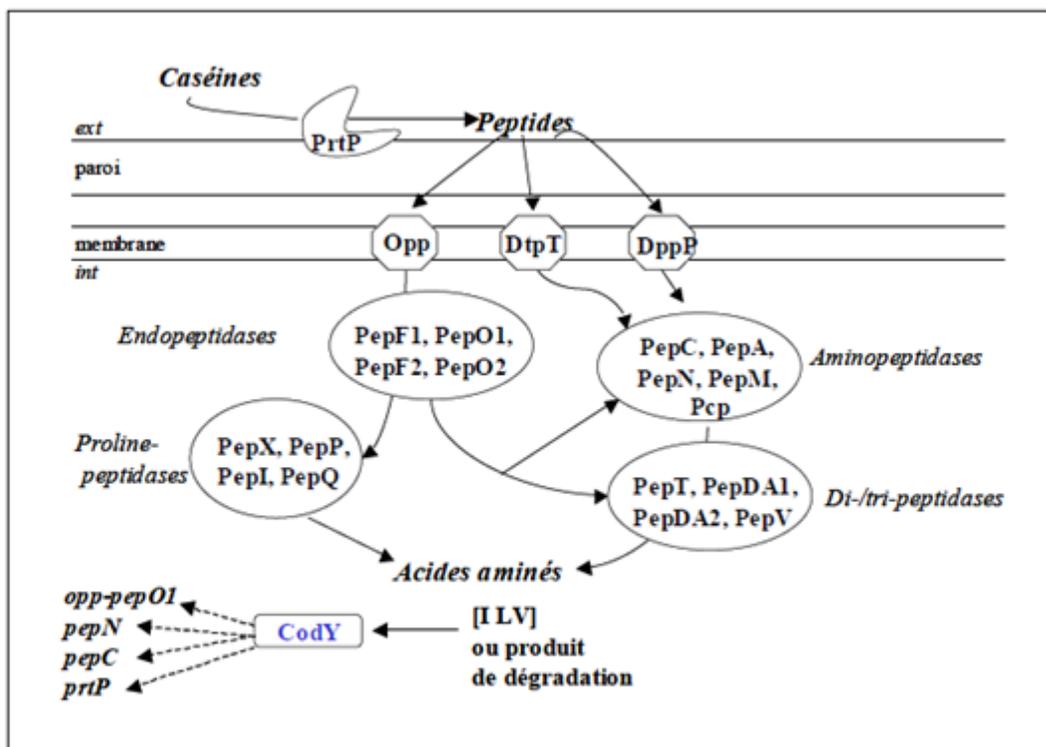


**Figure 26** : Représentation schématique du métabolisme de l'arginine chez *Lactococcus lactis* (Raynaud, 2006)

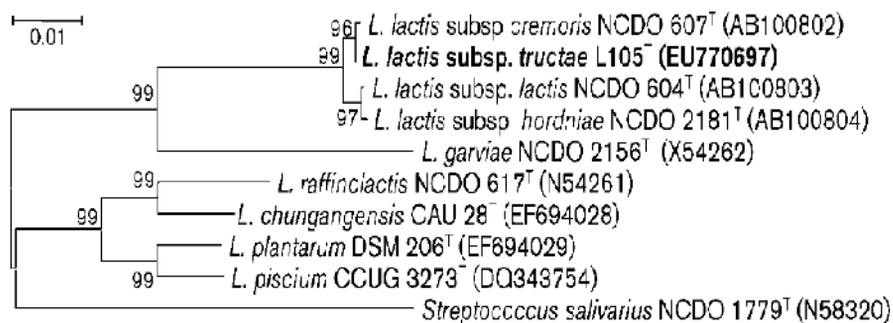
Les lactocoques possèdent un système protéolytique conséquent (figure 27).

### Taxonomie

Les lactocoques comportent actuellement 7 espèces; seule l'espèce *Lc. lactis* comporte des sous-espèces, au nombre de 4 actuellement (*lactis*, *cremoris*, *hordniae*, et, depuis 2011, *tructae*) (<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>). La sous-espèce *lactis* comporte le biovar *diacetylactis* (utilise le citrate), considérée auparavant comme une sous-espèce. La sous-espèce *hordniae*, très proche de la sous-espèce génotypique *lactis*, ne fermente pas le lactose (tableau 14). La sous-espèce *tructae* est très proche de la sous-espèce génotypique *cremoris* (Figure 28). A l'inverse des 3 autres sous-espèces qui sont homofermentaires strictes, elle présente un métabolisme hétérofermentaire facultatif (tableau 14).



**Figure 27** : Représentation schématique du système protéolytique et régulation de l'expression des gènes du régulon protéolytique de *Lc. lactis* (Raynaud, 2006)



**Figure 28** : Position phylogénétique de la sous-espèce *tractae* au sein des espèces de lactocoques d'après les séquences codant le 16S rDNA (Pérez et al, 2011)

**Tableau 14** : Caractéristiques des souches de la sous-espèce *tractae* et d'autres taxons du genre *Lactococcus* (Perez et al., 2011). 1, 2, 3 : *Lc. lactis* subsp. *tractae*. Il manque l'espèce *Lc. fujiensis* (décrite simultanément en 2011)

Taxa: 1, L105<sup>T</sup>; 2, I3; 3, L101; 4, *L. lactis* subsp. *lactis* (DSM 20481<sup>T</sup> and LMG 7930); 5, *L. lactis* subsp. *hordniae* (DSM 20450<sup>T</sup> and LMG 9462); 6, *L. lactis* subsp. *cremoris* (DSM 20069<sup>T</sup> and LMG 8505); 7, *L. chungangensis* CAU 28<sup>T</sup>; 8, *L. garvieae* KCTC 3772<sup>T</sup>; 9, *L. piscium* DSM 6634<sup>T</sup> (results from Williams *et al.*, 1990; Teuber, 2009); 10, *L. plantarum* DSM 20686<sup>T</sup>; 11, *L. raffinolactis* DSM 20443<sup>T</sup>. Results for 1-3 and all antibiotic sensitivity tests are from this study. Other results obtained in this study agree with those of Teuber (2009) for taxa 4-6 and 8-11, Schleifer *et al.* (1985) for taxa 4, 5, 6, 8, 10 and 11 and Cho *et al.* (2008) for species 7. +, Positive; -, negative; v, variable; w, weak; ND, no data; s, sensitive; r, resistant; w, weakly resistant.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Growth in 4% (w/v) NaCl	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Production of arginine dihydrolase*	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Acid from <sup>†</sup> :											
Ribose*	+	+	+	+	-	-	ND	+	-	-	v
D-Xylose	-	-	-	+	-	‡	-	-	+	-	v
Mannitol*	+	+	+	v	-	-	+	-	+	+	-
Lactose*	+	+	+	v	-	+	-	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Sucrose	+	+	+	v	+	-	+	-	+	+	+
Raffinose*	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Amygdalin*	+	+	+	w	-	-	+	+	+	+	-
Assimilation of gluconate <sup>†</sup>	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-
Resistance/sensitivity to:											
Cefuroxime	s	s	s	r	s	s	s	s	s	s	s
Tetracycline	s	s	r	s	v	w	s	s	s	s	s
Erythromycin	r	r	r	s	s	s	r	r	s	s	s
Polymyxin B	r	r	r	r	s	s	w	r	r	r	w

\*After 24h of incubation in API 20 STREP.

†After 24h of incubation in API 50 CH.

‡Results were positive for strain KCCM 40699<sup>T</sup> (Cho *et al.*, 2008).

Les espèces *Lc. lactis*, avec les sous-espèces *lactis* et *cremoris*, et *Lc. garviae* ont été isolées de produits laitiers.

Jusqu'à maintenant, la différenciation phénotypique des sous-espèces *cremoris* et *lactis* de *Lc. lactis* était basée sur cinq critères : utilisation de l'arginine, et capacité à croître à 40 °C, en présence de 4% de NaCl, à pH 9.2 et en présence de maltose, ces cinq caractères étant négatifs pour la sous-espèce *cremoris* (tableau 15). Le phénotype *cremoris* est peu isolé de produits laitiers.

### **Isolement et identification**

**Tableau 15** : Différences phénotypiques entre *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. (Teuber et al., 1995). *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* n'existe plus (= actuellement *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*).

Properties	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> †	<i>Lc. lactis</i> subsp. ' <i>diacetylactis</i> '†	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> †
Growth at 10°C	+	+	+
Growth at 40°C	+	+	–
Growth at 45°C	–	–	–
Growth in 4% NaCl	+	+	–
Growth in 6.5% NaCl	–	–	–
Growth at pH 9.2	+	+	–
Growth with methylene blue (0.1% milk)	+	+	–
Growth in presence of bile (40%)	+	+	+
NH <sub>3</sub> from arginine	+	+	–
CO <sub>2</sub> from citrate	–	+	–
Diacetyl and acetoin	–	+	–
Fermentation of maltose	+	+	Rarely
Hydrolysis of starch	–	–	–
Heat resistance (30 min at 60°C)	v	v	v
Serological group	N	N	N
GC content of DNA (mol%)	33.8–36.9	33.6–34.8	35.0–36.2

\*Data taken from Teuber *et al.* (1991).  
†+, positive; –, negative; v, variable.

Or, avec l'analyse génotypique de l'espèce *Lc. lactis*, on s'est aperçu que les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* ne sont pas superposables aux sous-espèces phénotypiques *lactis* et *cremoris* décrites antérieurement. Les souches de génotype *Lc. lactis* subsp. *lactis* peuvent en effet avoir le phénotype *lactis* ou le phénotype *cremoris* (Rademaker et al., 2007). Les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* peuvent être distinguées par leurs profils phénotypiques, en se basant sur de nouveaux phénotypiques, à

savoir fermentations de substrats carbonés, activités enzymatiques et productions de composés volatiles (Fernandez et al., 2011). Si les 20 souches étudiées par Fernandez et al. (2011) avaient été identifiées sur la base des cinq phénotypiques classiques, elles auraient été toutes nommées *Lc. lactis* subsp. *lactis* (tableau 16), alors que la moitié d'entre elles présentent le génotype de la sous-espèce *cremoris* (tableau 16).

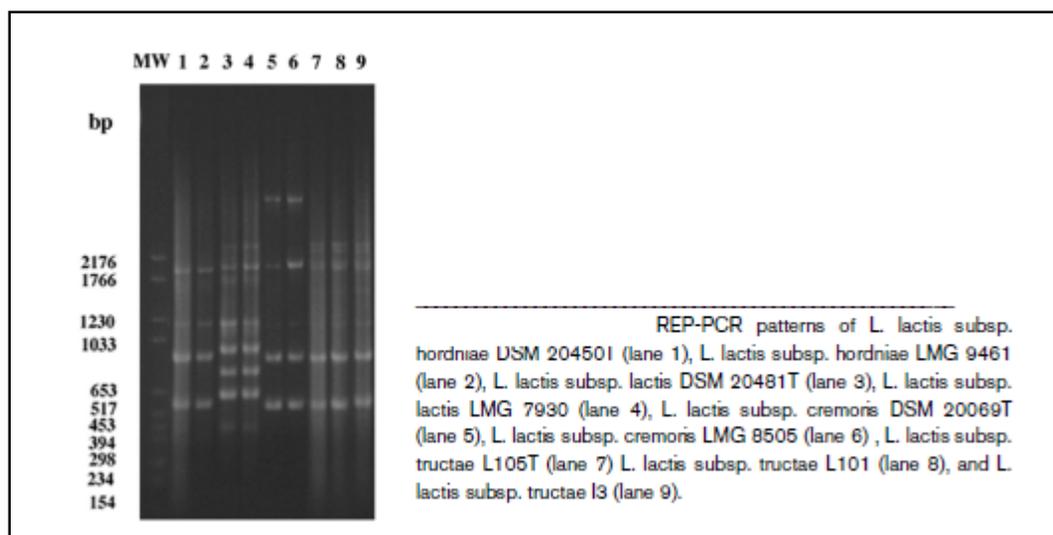
**Tableau 16** : Caractéristiques phénotypiques des 20 souches sauvages de *Lc. lactis* subsp. *lactis* et subsp. *cremoris* isolées de laits crus et de fromages fabriqués sans levains (Fernandez et al., 2011)

Genotype/strain	Phenotypic properties										
	pH in milk 22°C, 24 h	Hydrolysis of hippurate	Hydrolysis of α-gluconate	Citrate utilization	Acetoin production	Growth at or in					
						40°C	45°C	4% NaCl	6.5 NaCl	pH 9.2	pH 9.6
<i>genotype lactis</i>											
1AA59	4.19	-	+	-	-	+	-	+	-	W	-
CAS3	4.14	+	+	-	-	+	W	+	+	+	-
L39	4.69	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
3AA15	4.14	+	+	-	-	+	W	+	W	+	-
2BA36	6.17	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
1A38	4.89	+	+	-	-	+	-	+	W	+	+
2A83	6.37	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
GE-1	4.17	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Q1-6	4.78	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
4AA10	5.76	-	+	-	-	+	-	+	-	W	-
CECT 185 <sup>T</sup>	4.24	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>genotype cremoris</i>											
1AA23	4.24	+	+	-	-	+	-	+	W	+	W
2A5	4.30	+	+	-	-	+	-	+	W	+	+
2A22	4.29	+	W	-	-	+	-	+	W	+	W
2A27	4.27	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
3AA9	4.32	W	W	-	-	+	-	+	-	+	W
3AA11	4.23	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
3AA23	4.19	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
LC44	4.23	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
GE2-14	4.25	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
4AA28	4.25	+	+	-	-	+	-	+	-	+	W
CECT 96 <sup>T</sup>	4.28	+	-	-	W	-	-	-	-	-	-

w, weak reaction or growth.  
CECT 185<sup>T</sup> and CECT 96<sup>T</sup> are the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* type strains, respectively.

Les cinq critères phénotypiques classiques ne sont donc pas valables pour identifier les sous-espèces de l'espèce *Lc. lactis*. Par contre, ils restent pertinents pour caractériser les souches de *Lc. lactis* en technologie laitière: le phénotype classique *Lc. lactis* subsp. *lactis* est apprécié pour sa robustesse et sa tolérance à des températures et des concentrations en sel élevées alors que le phénotype classique *Lc. lactis* subsp. *cremoris* est appréciée pour fabriquer les fromages affinés.

De très nombreuses techniques d'empreintes génétiques permettent de différencier les sous-espèces de *Lc. lactis* (Fernandez et al., 2011), en particulier la technique Rep-PCR avec l'amorce (GTG)<sub>5</sub> (Rademaker et al., 2007 ; Svec et Sedlacek, 2008 ; figure 29).



**Figure 29** : Empreintes Rep-PCR avec amorce (GTG)<sub>5</sub> des sous-espèces de *Lc lactis* (Pérez et al., .2011)

De même des amorces spécifiques permettent de différencier par PCR les sous-espèces *lactis* et *cremoris* (Beimfohr et al., 1997 tableau17 ).

**Tableau 17** : Analyse par PCR et RFLP du gène *gadB* chez *Lc. lactis* (Nomura, 2002)

Strain	PCR fragment of:		Digestion with <i>AseI</i>
	~600 bp	~560 bp	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetyllactis			
ATCC 13675	+	-	+
NIAI 01-7	+	-	+
DRC1	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			
ATCC 19435	+	-	+
NIAI 527	+	-	+
ATCC 9936	+	-	+
IL1403	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>			
MG1363	-	+	+
ATCC 19257	-	+	-
H-61	-	+	-
HP	-	+	-
<i>S. thermophilus</i> 9Y	-	-	ND*
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	-	-	ND
<i>E. faecalis</i> IFO 12964	-	-	ND
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	-	-	ND

\* ND, not determined.

## II.6 Genre *Enterococcus*

### **Morphologie**

Les entérocoques sont des coques à Gram positif, se présentant de manière isolée ou en paires ou en courtes chaînes ou en petits amas (*Enterococcus canintestini*). Leur morphologie peut varier selon les conditions de culture. Ainsi, à partir d'une culture en bouillon au thioglycolate, les cellules sont souvent ovales et groupées en courtes chaînes alors que, prélevées sur un milieu solide, les cellules apparaissent parfois comme des cocco-bacilles.

### **Habitat et rôle**

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans les eaux usées, dans l'eau douce, dans l'eau de mer, dans le sol et sur les végétaux. La plupart des espèces du genre *Enterococcus* participent à la composition des microflores intestinales. Chez les animaux domestiques, *E. durans* n'est retrouvé que dans l'intestin de veaux préruminants et les jeunes poulets, alors qu'*E. hirae* est fréquemment isolé de la microflore intestinale de nombreuses espèces domestiques (Devriese et al., 2002).

On retrouve couramment les entérocoques dans le lait et les produits laitiers, les produits carnés et de la pêche. Dans les produits laitiers, ils atteignent au maximum des niveaux de  $10^7$  cellules par g (Foulquié-Moreno et al., 2006).

Certaines souches d'*Enterococcus faecium* posséderaient un effet favorable sur la croissance des animaux par compétition avec les germes pathogènes.

De nombreux auteurs proposent que les entérocoques, de par leur présence et leurs activités métaboliques, puissent directement contribuer aux caractéristiques sensorielles de fromages affinés, en particulier ceux fabriqués à partir de lait cru. Mais leur rôle direct n'a jamais été démontré (Foulquié-Moreno, 2006). Les entérocoques n'ont pas toujours eu d'effet significatifs sur les caractéristiques sensorielles des fromages affinés lors de leur ajout en fabrication fromagère (pas/peu d'effet : Sarantinopoulos et al., 2002 ; Rea et al., 2004 ; Bouton et al., 2009; Rasouli et al., 2012).

Dans les produits laitiers et notamment les fromagesensemencés en entérocoques, les entérocoques produisent de la tyramine (issue de la décarboxylation de la tyrosine) mais à des doses qui ne peuvent être responsables de troubles circulatoires à l'origine d'hypertension et de migraine (Rea, 2004).

### **Pouvoir pathogène**

Au contraire de la plupart des LAB, les entérocoques ne sont pas considérés comme SAFE (Ogier et Serror, 2008).

Chez les animaux, les entérocoques sont isolés de mammites, de pneumonies, de vaginites, d'arthrites, d'endocardites, de septicémies, de conjonctivites, de blépharites... Six espèces ont un pouvoir pathogène particulier.

Chez l'homme, les entérocoques sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables de septicémies, d'endocardites (environ 5 à 15 p. cent des endocardites bactériennes), d'infections urinaires, de surinfections des plaies (notamment chirurgicales), d'abcès intra-abdominaux, de pleurésies, d'infections néonatales, de méningites, d'infections nosocomiales (les entérocoques sont responsables d'environ 10 p. cent des cas d'infections nosocomiales et notamment d'infections urinaires). La fréquence des infections graves à entérocoques est en augmentation car ils sont sélectionnés par les antibiotiques à large spectre du fait de leur résistance naturelle et de leur résistance acquise à de nombreux antibiotiques (Biavasco et al., 2007). L'espèce la plus fréquemment en cause est *Enterococcus faecalis* (environ 85 à 90 p. cent des souches isolées) puis *Enterococcus faecium* (environ 5 à 10 p. cent des souches isolées, *Enterococcus durans* et *Enterococcus hirae* n'atteint pas 1 p. cent ; (Hancock et Gilmore, 2000). Aux Etats-Unis, une haute prévalence d'entérocoques résistants a été reportée dans le milieu hospitalier, associée à une faible prévalence dans la population humaine, les animaux et les produits alimentaires issus de produits animaux, Au contraire, en Europe, une faible prévalence d'entérocoques résistants a été observée en milieu hospitalier, exceptée en Europe du Sud; cette dernière a pu être liée à l'emploi, jusqu'à son interdiction en 1997, de la glycoprotéine *avoparcine* comme stimulateur de croissance dans les élevages (Biavasco et al., 2007). Malgré tout, depuis 2000, le nombre d'isolats cliniques résistants, particulièrement des isolats d'*E. faecium* augmentent en Europe, pour des raisons encore incomplètement connues (Bourdon et al., 2011).

### **Physiologie et métabolisme**

Ce sont des bactéries non sporulées, aéro-anaérobies (anaérobies aérotoleérantes), catalase négative (certaines espèces ont cependant une activité catalase en présence d'hème (Frankenberg et al, 2002)), homofermentaires avec production de l'isomère L du lactate, et cultivant avec un optimum thermique de 35 °C. Les entérocoques sont capables de résister à des conditions hostiles : culture à 10 °C ou à 45 °C, culture à pH 9,6 (ce test semble donner des résultats peu fiables et les résultats ne sont souvent pas disponibles pour les dernières espèces décrites), culture en présence de 40 p. cent de bile, culture en présence de 6,5 p. cent de NaCl, et résistance à un chauffage de 60 °C durant 30 minutes.

Les espèces *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* sont de médiocres agents acidifiants et protéolytiques du lait, *E. faecalis* présentant les plus fortes activités (Foulquié Moreno, 2006).

Les espèces *E. faecalis*, *E. durans* et *E. faecium* co-métabolisent le lactose et le citrate du lait (Foulquié-Moreno, 2006; Cabral et al., 2007; De Vuyst, 2011) selon la voie métabolique commune aux LAB indiquée figure 10.

Le genre *Enterococcus* inclut des espèces qui sont parmi les plus importantes espèces multi-résistantes aux traitements lors d'infections nosocomiales (Arias et Murray, 2012). Les entérocoques sont naturellement résistants à la pénicilline G et aux autres bêta-lactamines, y compris les céphalosporines et ils présentent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides et aux lincosamides. La résistance acquise aux glycopeptides a été mise en évidence en 1988 en France et en Grande Bretagne. Chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, cette résistance est due aux phénotypes VanA, VanB et VanD (voir définition au-dessous). Le phénotype VanA est également responsable d'une résistance acquise chez *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* et *Enterococcus raffinosus*. En pratique, la majorité des souches résistantes, isolées de cas cliniques, possède le phénotype VanA ou, dans une moindre mesure, VanB (Euzeby, 1997).

La résistance aux glycopeptides est d'une importance considérable car elle pose d'importants problèmes pour le traitement des infections graves dues à des souches déjà multi-résistantes. L'augmentation du nombre de souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine rend le traitement d'infections nosocomiales à entérocoques de plus en plus difficile (Fisher and Phillips, 2009).

Des facteurs de virulence ont été identifiés chez *E. faecalis*, et dans une moindre mesure *E. faecium*, qui aident les entérocoques à s'implanter chez l'hôte (Ogier et Serror, 2008; Fisher and Phillips, 2009).

Les entérocoques étant fortement recombinants, ils ont la capacité de modifier leur pouvoir pathogène et de s'adapter rapidement à l'environnement hospitalier par acquisition de gènes d'autres pathogènes et transfert de gènes à d'autres pathogènes (Laverde Gomez et al., 2011). De ce point de vue, une transmission de la résistance à la vancomycine à des souches de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* résistantes à la méthicilline rendrait tout traitement impossible (expérimentalement, un tel transfert a été observé entre une souche de *Enterococcus faecalis* et une souche de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Michel et Gulmann, 1997).

Selon les antibiotiques concernés par la résistance et selon la possibilité d'une induction par la vancomycine et la teicoplanine, 4 phénotypes de résistance sont observés (Euzeby, 1997) :

- Le phénotype VanA est caractérisé par une résistance de haut niveau vis-à-vis de la vancomycine (CMI comprise entre 128 et plus de 1000 mg/L) et de la teicoplanine (CMI comprise entre 16 et 512 mg/L) et inductible aussi bien par la vancomycine que par la

teicoplanine. Ce type de résistance est codé par des plasmides conjugatifs portant des transposons (Tn 1546). Expérimentalement, les plasmides de résistance sont transférables par conjugaison d'entérocoques à des *Bacillus* sp., des *Streptococcus* sp., à *Lc. lactis*, à *Listeria monocytogenes*, à *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* et la résistance s'exprime chez les bactéries réceptrices. L'isolement à partir de selles de souches de *Arcanobacterium haemolyticum* et de *Cellulomonas (Oerskovia) turbata* résistantes à la vancomycine et portant le gène *vanA* est une illustration de la réalité d'un tel transfert dans des conditions naturelles. L'acquisition de gènes *vanA* ou *vanB* par des souches de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* résistantes à la méthicilline supprimerait la majeure partie des possibilités thérapeutiques actuelles.

- Le phénotype VanB est induit par la vancomycine mais pas par la teicoplanine, il provoque une résistance à des niveaux variables vis-à-vis de la vancomycine (CMI comprise entre 4 et 1024 mg/L) mais pas vis-à-vis de la teicoplanine (CMI comprise entre 0,25 et 2 mg/L). La résistance est transférable par des transposons composites en situation chromosomique.

- Le phénotype VanC n'est pas transférable, il confère une résistance modérée à la vancomycine (CMI comprise entre 2 et 32 mg/L) et une résistance de très bas niveau vis-à-vis de la teicoplanine (CMI comprise entre 0,12 et 2 mg/L).

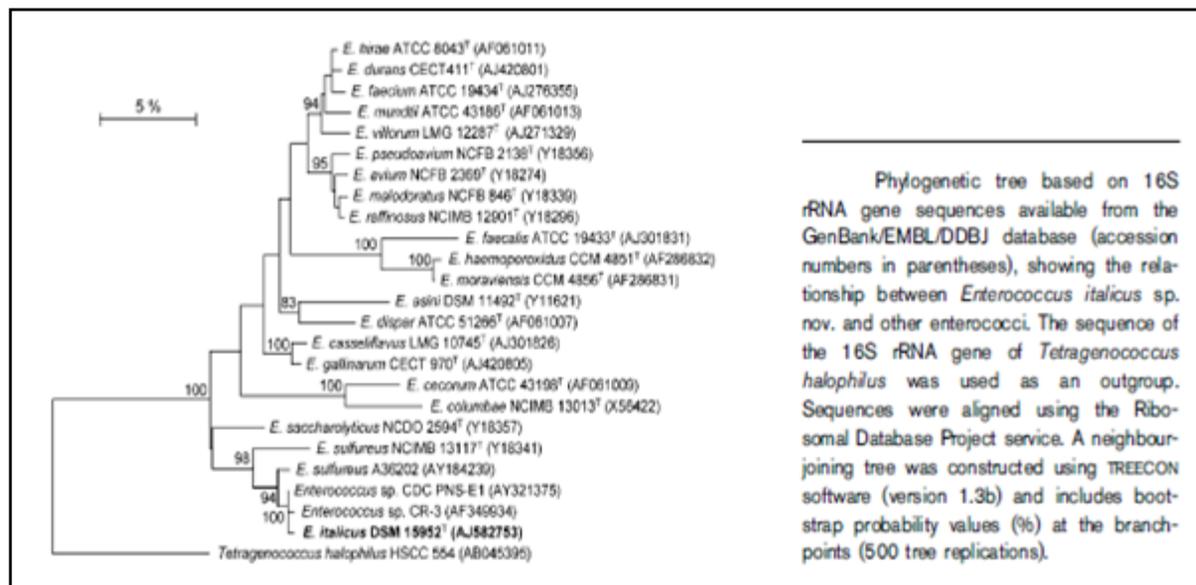
- Le phénotype VanD est transférable et il se traduit par une résistance modérée à la vancomycine (CMI comprise entre 16 et 64 mg/L) et une résistance de bas niveau vis-à-vis de la teicoplanine (CMI comprise 2 et 4 mg/L).

### **Taxonomie**

Le genre *Enterococcus* appartient à la famille des *Enterococcaceae* de l'ordre des *Lactobacillales* (cf. II-3.). Il comporte actuellement 40 espèces et aucune sous-espèce <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html> (Euzéby, 1997).

Les analyses génétiques (étude des ARNr 16S, étude de l'espace intergénique 16S-23S) montrent que le genre *Enterococcus* est hétérogène et qu'il est possible de reconnaître des groupes d'espèces au sein de ce genre (figure 30). Toutefois, la composition de ces groupes est différente selon les techniques utilisées et selon les auteurs ; après compilation des données, (Euzéby, 1997 : <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>) propose 6 groupes (i) le groupe Avium (*Enterococcus avium*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus hermanniensis*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus pseudoavium* et *Enterococcus raffinosus*); (ii) le groupe Cecorum (*Enterococcus cecorum* et *Enterococcus columbae*); (iii) le groupe Dispar (*Enterococcus dispar*, *Enterococcus asini* et *Enterococcus pallens*); (iv) le groupe **Faecalis** (*Enterococcus faecalis*\*, *Enterococcus haemoperoxydus*, *Enterococcus moraviensis* et *Enterococcus ratti*); (v) le groupe **Faecium** (*Enterococcus faecium*\*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus durans*\*, *Enterococcus hirae*\*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus villorum* et *Enterococcus lactis*\*

(Morandi et al., 2012) et (vi) le groupe **Gallinarum** (*Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus casseliflavus*\*). Les espèces *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus saccharolyticus* et *Enterococcus sulfureus* constituent des **groupes séparés**. *Enterococcus camelliae* et *Enterococcus italicus*\* sont apparentés à *Enterococcus sulfureus*. \*espèces retrouvées dans le lait et les produits laitiers.



**Figure 30** : Arbre phylogénétique de 24 espèces d'entérocoques basé sur la séquence codant le 16S rDNA (Grazia et al., 2004).

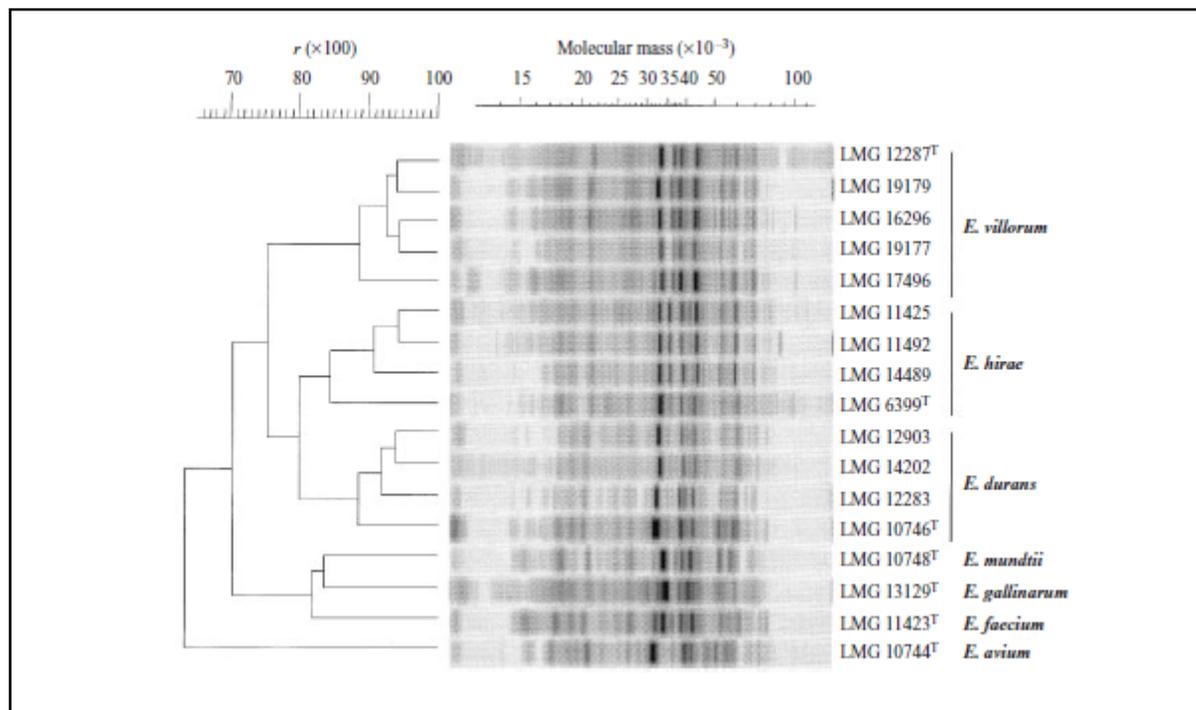
### Identification

Les caractères phénotypiques ne permettent pas de différencier à coup sûr les entérocoques des autres coques à Gram positif et catalase négative. Un kit d'identification par hybridation ADN-ARN, AccuProbe *Enterococcus* (Gen-Probe), est utilisable pour confirmer l'appartenance au genre *Enterococcus*. Toutefois, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus pallens*, et *Enterococcus saccharolyticus* ne réagissent pas avec cette sonde alors que des bactéries n'appartenant pas au genre *Enterococcus* mais à la même famille, comme des représentants du genre *Vagococcus* (*Vagococcus fluvialis* et *Vagococcus salmoninarum*) donnent une réaction positive (Euzéby, 1997). L'amorce enc38a dessinée par Frahm et al. (1998) permet par PCR, dans les conditions décrites par Bendimerad et al. (2012), de confirmer aussi l'appartenance au genre *Enterococcus* (réaction positive avec les espèces *E. durans*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, et *E. casseliflavus*); les autres espèces d'entérocoques n'ont pas été testées).

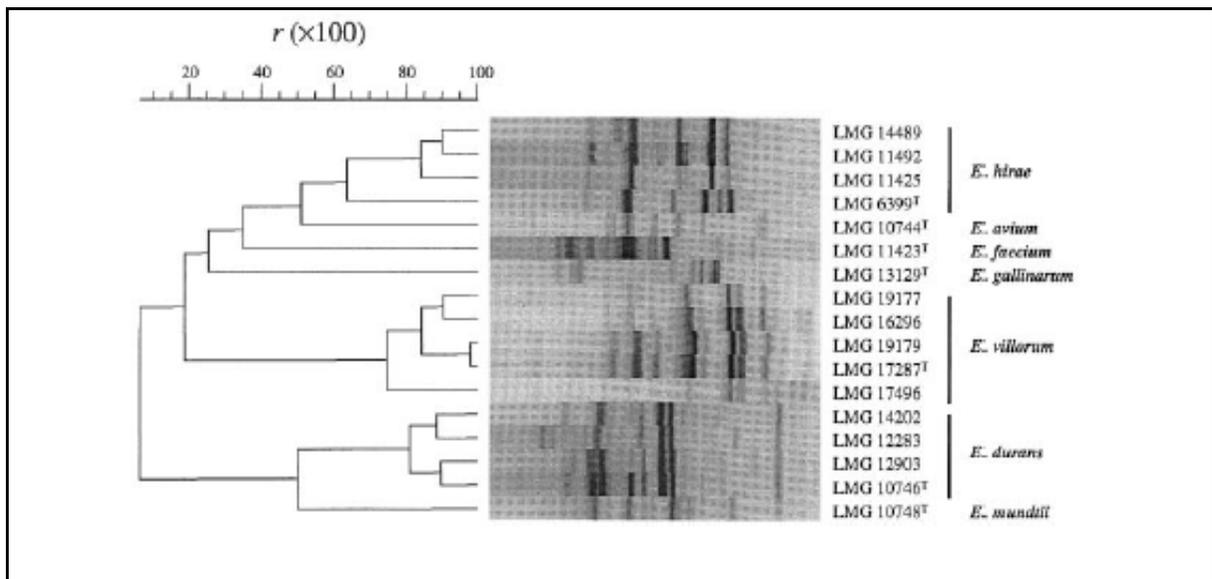
L'utilisation de galeries prêtes à l'emploi ne conduit pas toujours à une identification correcte des espèces d'entérocoques (selon les kits, le pourcentage d'identification correcte varie de 61 à 95 p. cent) et les espèces les plus récemment décrites ne sont pas citées dans les bases de données (Euzéby, 1997). En particulier, aucun caractère phénotypique ne permet de différencier à coup sûr les entérocoques *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* et *Enterococcus villorum* qui appartiennent à un même groupe phylogénétique (Devriese et al., 2002).

Ainsi, pour Devriese et al. (2002), une identification basée uniquement sur des critères biochimiques devrait amener à répondre entérocoque du groupe "*Enterococcus durans/Enterococcus hirae/Enterococcus villorum*" et non *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* ou *Enterococcus villorum*.

En fait, seul le diagnostic moléculaire d'espèce permet d'affirmer qu'une bactérie est un *Enterococcus* sp. L'amplification par PCR (utilisant par exemple comme amorce l'oligonucléotide D11344) suivie d'une électrophorèse, le séquençage de l'ADN 16S, ou l'analyse électrophorétique des protéines cellulaires permettent un diagnostic d'espèce (exemple pour *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* ou *Enterococcus villorum* (figures 31 et 32).



**Figure 31** : Profil protéique de souches d'entérocoque phylogénétiquement proches (Vancanneyt et al., 2001)



**Figure 32** : Dendrogramme montrant le profil des souches d'entérocoques obtenu par amplification PCR avec l'amorce D11344 (Vancanneyt et al, 2001)



# CHAPITRE III

## *Produits laitiers*

### III PRODUITS LAITIERS

Il existe une très grande variété de produits laitiers, laits fermentés, beurre, fromages, dans le monde (forme, goût) selon la source du lait (vache, brebis, chèvre, etc.) et la technologie appliquée

(Traitement (s) du lait mis en œuvre, utilisation de levains, température appliquée, etc.). Ainsi jusqu'à plus de 1000 variétés de fromage ont pu être répertoriées (Fox et Mc Sweeney, 2004).

Les fromages constituent une forme ancestrale de conservation des constituants du lait, et possèdent par ailleurs un haut intérêt à la fois nutritif et épicurien (Fox et Mc Sweeney, 2004).

Le mot «Fromage» (...) procède (v. 1135) d'un bas latin (*caseus*) *formaticus* « (fromage) fait dans une forme », *formaticus* dérivant du latin classique *forma*. « Fromage », à côté de la forme attendue « fromage » attestée en 1180, provient d'une métathèse\* qui a détaché le mot de son origine» \*modification phonétique (Rey, 1994).

#### III-1 Définition

C'est une conserve de deux constituants insolubles du lait, la caséine qui en forme obligatoirement la charpente, et la matière grasse qui est présente en proportion variable (Alais et Linden, 1997).

La norme FAO/OMS n°A6 du Codex Alimentarius (1996) définit le fromage par : « Le fromage est le produit frais ou affiné de consistance solide ou semi-solide dans lequel le rapport protéine de sérum/caséine ne dépasse pas celui du lait et obtenu :

a/ par coagulation complète ou partielle des matières premières suivantes : lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème, ou babeurre, seul ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par l'égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation et/ou

b/ par l'emploi de technique de fabrication entraînant la coagulation du lait et ou de matière provenant du lait de façon à obtenir un produit ayant des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques similaires à celles du produit défini au paragraphe a ».

#### III-2 Historique

D'après Fox et Mc Sweeney (2004) la découverte du fromage fut probablement le fait du hasard, on n'en connaît pas l'origine précise, mais on sait grâce à des découvertes archéologiques qu'il se fabrique du fromage depuis les origines de l'élevage, il y a environ huit mille ans, dans le Croissant Fertile. L'homme s'aperçut que le lait qu'il entreposait

coagulait et, qu'une fois séparé de son sérum, le coagulum devenait une masse compacte qui pouvait sécher, et donc se conserver et être transportée. L'acidification spontanée à l'origine de la coagulation entraînant du fait de sa lenteur une remontée de la crème à la surface, les laits fermentés, le petit lait aigre, et le beurre furent sans doute les premiers produits laitiers. Les laits de brebis et de chèvre furent apparemment les premiers laits transformés, les ovins et les caprins ayant été les premiers animaux domestiqués.

### III-3 Technologie fromagère

La fabrication de fromages comprend toujours les trois phases initiales suivantes : coagulation, acidification, égouttage. Ces phases déterminent les caractéristiques du fromage consommé frais et les conditions de développement et d'expression des microorganismes responsables de l'affinage, si affinage il y a. Elle comprend souvent des phases de salage et d'affinage.

**Coagulation ou caillage** : correspond à un changement d'état physique irréversible dans lequel un lait au repos, initialement liquide, passe à l'état semi-solide généralement appelé gel ou plus spécifiquement coagulum (Alais., et Linden, 1995) , (Brulé et al., 1997).

Elle peut être obtenue par deux grandes voies qui conduisent à des coagulums aux propriétés différentes.

#### *Première voie : coagulation par voie acide*

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i = 4,6$ ) par acidification du lait

a/ biologique par des bactéries lactiques naturellement présentes dans le lait de fabrication ou apportées par des levains, ou

b/ par acidification chimique (addition de  $CO_2$  ou GDL), ou

c/ par ajout de protéines sériques à pH acide. Le pH de 4.6 provoque la floculation des micelles et la précipitation de la caséine entière déminéralisée (Alais et Linden, 1997).

La coagulation biologique est due à l'aptitude des bactéries lactiques à produire de l'acide lactique en quantité importante à partir des hydrates de carbone en particulier le lactose (Eck et Gillis, 1997). Le coagulum acide est constitué d'amas dispersés de caséine déminéralisée dépourvue de liaisons susceptibles de créer une force de concentration. La porosité du gel est réduite par manque de structure du réseau, mais sa perméabilité est satisfaisante.

#### *Deuxième voie: coagulation par voie enzymatique*

Elle est obtenue par l'hydrolyse des caséines par des enzymes protéolytiques de diverses origines

a/ végétale

b/ microbienne (enzymes extraits de culture liquide de certains champignons, exemple : *Rhizomucor miehi*)

c/ animale. Les enzymes sont la chymosine et la pepsine contenues dans le suc gastrique des animaux. Les enzymes peuvent être apportées sous formes de préparation coagulante obtenue à partir de macération de caillettes, ou sous forme d'enzymes purifiées obtenues par voie génétique.

Les techniques de coagulation par présure végétale sont traditionnellement utilisées dans certaines régions européennes sud-méditerranéennes, en Amérique latine et en Afrique, en particulier en Algérie (Nouani et al., 2009 ; Beka, 2011). Les présures végétales évitent de recourir à l'achat ou à la préparation de présure animale, et permettent de profiter d'une ressource gratuite et présente à portée de main. Le recours à la présure végétale est un des principaux éléments de la définition et de la différenciation de fromages d'appellation protégée portugais et espagnols. Les présures végétales les plus étudiées sont celles extraites du cardon ou de l'artichaut. L'utilisation de présure d'origine végétale au lieu de présure d'origine animale peut entraîner un rendement moindre, et des différences de texture et de goût des produits laitiers (plus acide et amer) du fait des activités protéolytiques non coagulantes plus élevées des premières. L'utilisation de présure issue du cardon au lieu de présure animale pour fabriquer des fromages à partir de lait de brebis entraîne une accélération de la vitesse d'affinage ( Chazarra et al., 2007 ;Galán et al., 2008).

La coagulation du lait par la présure comprend trois phases :

- L'hydrolyse de la caséine kappa en paracaséine et caséinomacropéptide(CMP),
- puis la coagulation proprement dite (agrégation des micelles), due à la perte du CMP dans le sérum,
- enfin, la réorganisation des liaisons entre les paracaséines des micelles de caséines forme le coagulum (Brulé et al., 1997).

Le plus souvent, la coagulation résulte de l'action conjuguée des enzymes protéolytiques et de l'acidification. C'est la coagulation mixte. Les propriétés des gels formés et leur aptitude à l'égouttage sont intermédiaires entre celles du coagulum obtenu par voie enzymatique et celle du coagulum obtenu par voie acide (Brulé et al., 1997).

### **Egouttage**

L'égouttage correspond à un simple écoulement statique du lactosérum.

C'est l'élimination progressive du lactosérum (par synérèse) qui s'accompagne de la rétraction et d'un durcissement du gel. Il conduit à un caillé dont l'extrait sec est plus ou moins élevé, et qui correspond au fromage formé (Brulé et al. 1997).

L'égouttage peut se faire lentement par moulage direct du caillé (pour les Bries et les fromages de chèvre) ou après son découpage (Munster), son brassage (Fourme d'Ambert),

son pressage (Reblochon, Saint-Nectaire) et/ou sa cuisson (fromages à pâte pressée cuite) (Alais et Linden, 1997) ou plus rapidement par centrifugation, ultrafiltration.

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation du lait. Il est constitué de 50% de matière sèche. Il contient une quantité importante de protéines, de lactose et des matières minérales; il est riche aussi en vitamine B (<http://www.euroserum.com/fr/notre-lactoserum/10/le-lactoserum.htm>). Il est le constituant essentiel du lait.

On distingue deux catégories de lactosérum :

- Lactosérum doux : dont l'acidité est inférieure à 1.8 g d'acide lactique par litre. Ce lactosérum présente un pH compris entre 5 et 6. Il comporte plus de lactose et moins de calcium et phosphore que le lactosérum acide.

- Lactosérum acide : dont l'acidité est supérieure à 1.8 g d'acide lactique par litre. Ce lactosérum présente un pH de l'ordre de 4.2.

### **Salage**

Le salage s'effectue de différentes façons, en saupoudrant le caillé de sel, en l'immergeant dans la saumure ou encore en le frottant avec un chiffon salé.

Le sel ralentit la production d'acide lactique, conserve le fromage, rehausse l'arôme et accélère le processus du séchage.

### **Affinage**

C'est le procédé du vieillissement du fromage, celui-ci est placé pendant une durée variable dans une salle ou une cuve spéciale parfois appelée « hâloir », ventilée ou non, dans laquelle la température et l'humidité sont contrôlées.

Pendant ce temps, le fromage peut être lavé, retourné, brossé ou déplacé, il devient plus compact, sa croûte se forme et son goût s'affirme.

## **III-4 Ecosystèmes des produits laitiers**

Les caractéristiques des produits laitiers dépendent du fonctionnement de leur écosystème des premières minutes de fabrication au moment de la dégustation.

Il existe une succession de modifications biochimiques, souvent plusieurs en parallèle, dans le produit tout au long de sa fabrication et, le cas échéant, de son affinage. La composition et la structure du produit varient ainsi continuellement. Si les modifications ont lieu au bon moment et en respectant un certain équilibre entre elles, les produits laitiers possèdent les caractéristiques souhaitées. Dans le cas contraire, le produit peut devenir inacceptable d'un point de vue sensoriel, sanitaire, etc.

Les modifications sont dues :

- a/ principalement aux activités métaboliques des microorganismes présents dans les levains ajoutés et/ou dans le lait cru en cas de fabrication au lait cru, et/ou dans l'environnement de fabrication/affinage,

- b/ puis aux activités enzymatiques présentes dans le lait cru (lipases, protéases, etc.),
- c/ enfin, aux activités enzymatiques pouvant être ajoutées en cours de fabrication (enzymes des présures, etc.).

Le niveau de ces activités, microbiennes ou non, dépend

- a/ des caractéristiques des microorganismes et des enzymes non microbiennes présents
- b/ de l'environnement physico-chimique des enzymes non microbiennes et des microorganismes, d'abord celui du lait mis en fabrication, puis celui du produit modifié continuellement par ces activités et les gestes technologiques (ajouts d'enzymes, brassage, pressage, salage, application de différentes températures, etc.),

Ainsi, alors que l'itinéraire technologique varie peu entre produits laitiers d'une même variété, on peut cependant obtenir des produits aux caractéristiques très différentes à la dégustation, en faisant varier la composition du lait mis en fabrication, microbienne et non microbienne, et en modifiant les gestes technologiques, bref en modifiant le fonctionnement de l'écosystème du produit.

### **III-5 Classification des fromages**

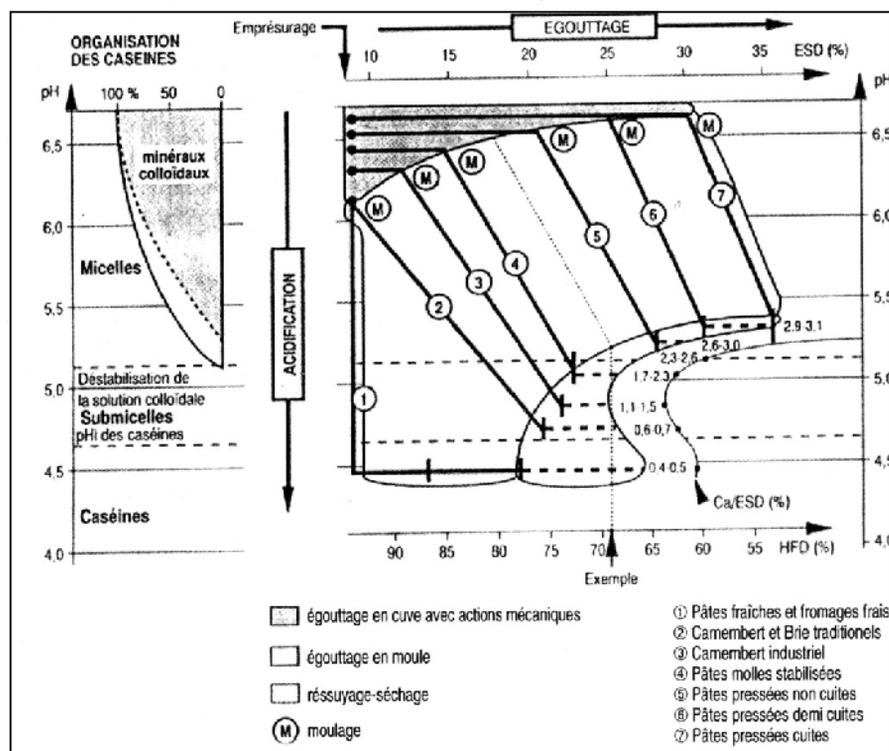
Sans qu'aucune liste définitive ne puisse être établie, de nombreuses tentatives de classification des variétés de fromages ont été faites, basées sur différents critères : texture, méthode de coagulation, indices d'affinage et/ou technologie.

La norme FAO/OMS (n°A-6, 1978 modifiée en 1990) donne la classification officielle des fromages en fonction de leur teneur en eau dans le fromage dégraissé (HFD), de leur teneur en matière grasse (G/S) et des principales caractéristiques d'affinage.

Selon cette norme, le fromage appelé *Jben* (cf. § III-6) fabriqué en Algérie, est un fromage à pâte molle, mi-gras et frais.

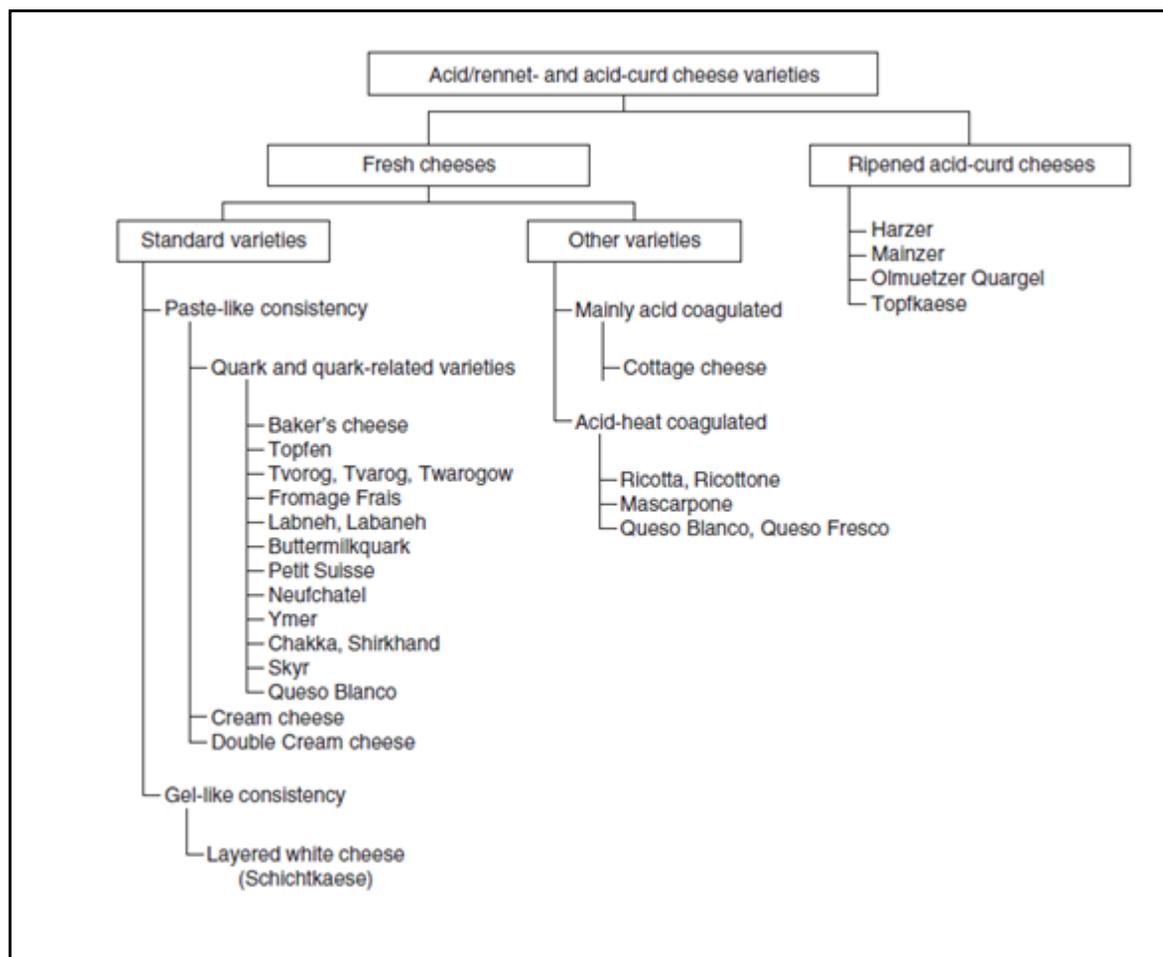
Mietton et al. (2004) ont proposé une classification basée sur les places respectives de l'égouttage et de l'acidification. Dans cette classification technologique, le fromage *jben* appartient à la classe 1, pâtes fraîches et fromages frais (figure 33).

Les laits fermentés et fromages algériens, tout comme leurs cousins africains, sont absents des schémas récapitulatifs et des revues décrivant les principales variétés de produits laitiers (Schultz-Collins et al., 2004), (Tamine et al., 2011), à cause de l'absence d'information accessible à leur sujet.



**Figure 33:** Classification technologique des fromages en fonction des places respectives de l'égouttage et de l'acidification (Mietton et al., 2004)

A notre avis, de part leur procédé technologique, le *Labneh*, surtout le traditionnel, et le *Jben* seraient des produits cousins. *Labneh*, *Labaneh*, désigne actuellement des yaourts concentrés produits à partir de lait entier incubé pendant 3.5 - 4.0 heures à 42-45°C avec des levains thermophiles appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus* associée aux espèces *Lactobacillus delbrueckii* ou *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* (Mehaia et al, 1995; Abou-Ayana, 2011); de la présure est éventuellement ajoutée, puis le caillé est égoutté. Cependant le *Labneh* fabriqué à partir de lait de chèvre était traditionnellement acidifié par des LAB mésophiles (Mehaia et El-Khadragy, 1999 ; Mehaia, 2005). Le fromage *jben* pourrait donc être rangé comme le *Labneh* parmi les fromages frais (Schultz-Collins et al., 2004). Selon ces auteurs, les fromages frais sont des fromages non affinés, qui sont fabriqués par la coagulation de lait, de crème ou de lactosérum, en utilisant une combinaison d'acide et de coagulant, ou d'acide et de chauffage. Ils sont prêts à être consommés tout de suite après fabrication. Ils sont présents dans la plupart des pays et des cultures. Le *Labneh* est cependant classé par Tamine et al. (2011) parmi les laits fermentés de catégorie indéfinie, faute de données (figure 34).



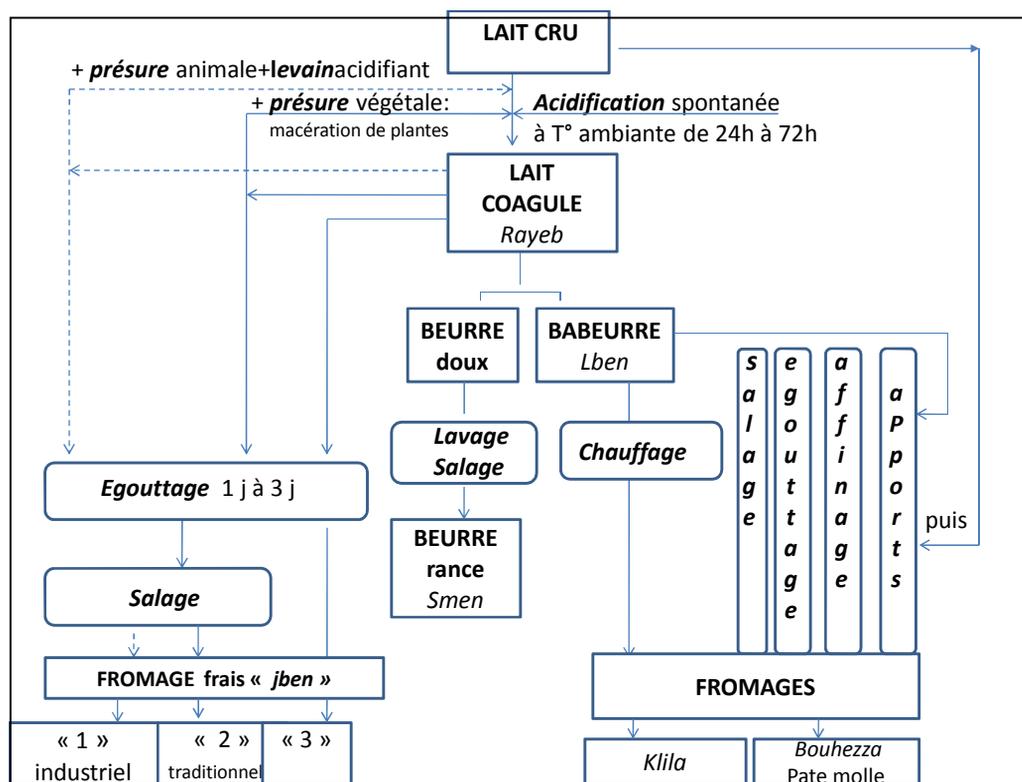
**Figure 34** : Variété de fromages frais (Tamine et al., 2011)

### III-6 Produits laitiers algériens

La fabrication de produits laitiers est traditionnelle en Algérie.

Les produits laitiers traditionnels algériens ont été peu caractérisés. Ils sont cousins de produits laitiers largement consommés dans beaucoup de pays méditerranéens et subsahariens (Koussou et al., 2007; Abou-Donia, 2008). En Algérie, laits fermentés et fromages sont fabriqués traditionnellement le plus souvent par les femmes à la maison (Medouni et al., 2005) et servent à l'autoconsommation; le surplus pouvant être vendu (Bencharif, 2001). Plusieurs produits traditionnels sont en voie de disparition pour différentes raisons dont la non disponibilité fourragère, l'exode rural et le changement des habitudes alimentaires (Aissaoui, 2006; Khaldi et al., 2006). Ceux dont l'usage est le plus répandu, comme le *Rayeb* et le *Jben*, tout en gardant le même nom, changent de procédé technologique du fait de leur industrialisation (Guizani et al., 2001; Benkerroum et Tamine, 2004).

La figure 35 schématise les méthodes de fabrication, et le tableau 18 montre les valeurs moyennes de quelques paramètres physico-chimiques.



**Figure 35** : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens (modifié d'après Lahsaoui, 2009)

### **Rayeb**

Nous n'avons pas trouvé de publication portant sur la caractérisation du *Rayeb* algérien. C'est un cousin des laits fermentés produits dans de nombreux pays méditerranéens et sub-sahariens.

Le *Rayeb* (ou *Raib*) est du lait caillé, traditionnellement obtenu après acidification spontanée à température ambiante de lait cru durant une période variant de 24 h à 72 h selon la saison. Le *Rayeb* est consommé tel quel ou transformé (figure 35).

Traditionnellement, la fermentation est associée à des LAB mésophiles appartenant aux leuconostocs et aux lactocoques présents naturellement dans les laits crus mis en œuvre. De nos jours, dans les zones urbaines et industriellement, la fermentation spontanée, lente, est remplacée par une fermentation plus rapide par des LAB thermophiles apportés sous forme de levains, comme décrit au Moyen-Orient par Guizani et al. (2001) et au Maroc par Benkerroum (2004).

**Tableau 18** : Physico-chimie de quelques produits laitiers algériens (Lahsaoui, 2009). *D*, degré dornic ; humidité(%) NaCl, matière grasse et protéines en g/100g fromage

Paramètres	Valeurs moyennes			
	<i>Lben</i> <sup>3</sup>	<i>Bouhezza</i> <sup>2</sup>	<i>Klila</i> <sup>1</sup>	<i>Smen</i> <sup>3</sup>
Humidité	90.8	64.24	12.530	14
PH	4.2	4.0	4.71	-
Acidité (°D)	60	20.8	42.24	-
NaCl	0.08	3.00	0.507	1.5
Lactose	2.14	ND	ND	1.2*
matière grasse	0.2	30.2*	13.843	81
protéines	1.93	0.08*	53.856	3.2*
lipides insaponifiables	-	-	-	0.3**
indice d'acide (mg KOH/g lipide)	-	-	-	52
indice peroxyde (meq/g lipide)	-	-	-	3.7

1- Boubekri et Ohta, 1995 échantillon collecté de Batna  
2- Aissaoui et al., 2006 (fromage à 10 semaine d'âge)  
3- Boubekri et al. 1984 cité par Tantaoui-Elaraki et al. (1987)  
\*- par rapport au poids sec  
\*\* - par rapport aux lipides totaux

### ***L'ben***

Le *L'ben* est un des produits-phare de la transformation artisanale du lait en Algérie. Il fait l'objet, associé à d'autres mets comme le fameux couscous, d'une large consommation. Le *Lben* (Tantaoui El Araki et El Marrakchi, 1987) est le petit lait issu du barattage puis de l'écémage du *Rayeb*. Il est aussi connu sous les noms de *leben* (Samet-Bali et al 2010), *Iban*, ou *laban* (Baroudi et Collins ,1978) Il ne doit pas être confondu avec la variété de fromage appelée *Labaneh* ou *Labneh* (cf....). Ouadghiri et al. (2009) ont décrit par des méthodes moléculaires la microflore LAB de huit *Lben* artisanaux marocains collectés dans des fermes rurales. Trois espèces de LAB y étaient dominantes, *Lb plantarum*, *Lc. lactis* et *L. pseudomesenteroides*. La composition physico-chimique du *L'ben* algérien est présentée tableau 18.

### ***Klila***

Pour éviter sa dégradation durant la phase de stockage, le *L'ben* est chauffé modérément (55 °C - 75 °C) jusqu'à la séparation du lactosérum; le coagulum obtenu, appelé *Klila*, fabriqué dans plusieurs régions de l'Algérie, est consommé comme un fromage frais après égouttage naturel ou à l'aide d'une pierre ; sinon, il est découpé puis séché (de 2 à 15 jours selon la saison), et ensuite utilisé après réhydratation comme un ingrédient dans des préparations culinaires. Sous sa forme déshydratée, il peut être conservé plusieurs années à température ambiante, dans des jarres en poterie ou en verre ou des sacs en peau

de chèvre/mouton. C'est un fromage similaire au *Jameed* au Moyen-Orient et au *Chhana* en Inde. (Lahsaoui, 2009). Boubekri et Ohta (1996) en ont isolé les LAB. La composition physico-chimique du *Klila* algérien est présentée tableau 18.

### **Zebda et Smen**

Le beurre frais *Zebda* est obtenu après barattage du *Rayeb*. Ce dernier est occasionnellement augmenté d'une quantité d'eau tiède (40-50 °C) à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre. Les globules gras apparaissant en surface, à la suite du barattage, sont séparés par une cuillère perforée. Le beurre frais obtenu présente une consistance molle du fait de la forte concentration en eau. Le surplus de beurre produit est transformé en beurre rancie *Smen* par lavage du beurre frais à l'eau tiède, saumurage, puis salage à sec (saupoudrage à la surface ; 8-10g/100g) (Benkerroum et Tamine, 2004). La composition physico-chimique du *Smen* algérien est présentée tableau 18.

### **Jben**

C'est un fromage frais, traditionnel dans le Nord algérien. Cette dénomination regroupe des trajectoires technologiques très différentes, aboutissant à des produits aux caractéristiques très variées. Nous n'avons pas trouvé de publication portant sur la caractérisation du *Jben* algérien.

Traditionnellement, il y a une étape d'acidification spontanée, à température ambiante, pendant 24 h à 72 h selon la température, comme celle conduisant au *Rayeb*, comme le montre la figure 35. Traditionnellement, le fromage *Jben* est fabriqué avec du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus L*), d'une plante épineuse sauvage (*Cynara humilis*) ou d'artichaut (*Cynara scolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille. (cf. § coagulation par voie enzymatique) (Nouani, 2009). On obtient le *Jben* noté «2 » (figure 35). Les fleurs entières sont mises à macérer dans le lait. Le végétal est utilisé pour accélérer la coagulation et pour donner un certain goût au fromage. La variété végétale utilisée varie d'une région à l'autre; elle donne un goût et une texture appréciés par les gens de la région concernée Le caillé est ensuite égoutté et salé ou non (figure 35).

Comme décrit au Maroc par Benkerroum et Tamine (2004), le *Jben* peut aussi être artisanalement fabriqué sans coagulation du lait cru par voie enzymatique; dans ce cas, le lait cru est seulement coagulé par l'acidification spontanée, puis le caillé est égoutté pendant 2 à 3 jours pour obtenir la consistance désirée (figure 35, *Jben* noté «3»). Des additifs peuvent être ajoutés après égouttage et salage (ail, persil, poivre,.....). Le fromage obtenu correspond dans d'autres pays arabes au fromage nommé *Jibneh Beida*.

Enfin un troisième procédé technologique, utilisant de la présure animale, du lait de vache et des levains acidifiants est utilisé industriellement (*Jben* noté «1», figure 35). En Algérie, la poudre de lait remplace le lait cru de vache (cf. §1.4).

Les levains thermophiles pour yaourt ne sont pas utilisés pour produire du *Jben*.

Aucune composition physico-chimique de *Jben* algérien n'a été trouvée. Au Maroc, le *Jben* a en moyenne une acidité titrable de 1.04 %, un taux de MG de 16,5 %, un taux de protéines de 15,8 % et un pH de 4,2. Selon les régions, il est salé puis égoutté 10 jours, ou non salé et égoutté moins de 4 jours, présentant respectivement un EST moyen de 45,6 % ou 29,4 % (Thomas et Dubeuf, 1995).

### ***Bouhezza***

C'est un fromage affiné traditionnel, à pâte molle, des régions de l'Est Algérien (Oum el Bouaghi, Khenchella, Batna, Biskra, etc...) jadis réputées par une pratique importante de l'élevage extensif des caprins et des ovins. En effet, à l'origine, le *Bouhezza* était traditionnellement le produit de la transformation du lait de chèvre et de brebis; toutefois la tendance actuelle semble s'orienter vers l'utilisation du lait de vache (Mekentichi, 2003; Aissaoui et al. 2006).

Le fromage est obtenu après transformation du *Lben* dans une outre, la *Chekoua*, faite de peau de chèvre préalablement traitée avec du sel et du genièvre (Aissaoui et al., 2006).

L'égouttage, le salage et l'affinage du *Bouhezza* sont réalisés simultanément dans la *Chekoua* pendant une durée de 2 à 3 mois. Au cours de la période d'affinage, du *L'ben* et du lait sont rajoutés au contenu de la *Chekoua*. Au stade de la consommation le fromage est pétri avec incorporation de poudre de piment rouge, ce qui lui donne une caractéristique particulière (Aissaoui et al, 2006).

La composition physico-chimique du *Bouhezza* algérien est présentée tableau 18.

### ***Kemaria*, Takemarit**

Fromage traditionnel à base de lait de chèvre, la *Kemariya* ou *Takkmerit* (Berbère) est fabriqué par les femmes selon des procédés traditionnels dans les régions du Sud algérien notamment dans les wilayates de Ghardaia et Naama. Le *Kemariya* est un fromage utilisé à des fins festives et souvent servie avec du thé. Il est coagulé par des présures végétales et est aussi fabriqué à partir de lait de vache et de chamelle (Nouani et al., 2009).

Du fait de la forte demande de ce fromage, il est de plus en plus produit par des PME selon des processus semi industriels pour être commercialisé aussi bien sur les marchés traditionnels qu'au niveau de certaines grandes surfaces du Nord algérien.

A côté des produits précédents, il existe des préparations locales circonscrites à certaines régions de l'Algérie.

***Ighounane***

Fromage fabriqué en Kabylie à partir du colostrum ( premier lait de vache venant de mettre bas), la préparation d'*Ighounane* se fait dans des ustensiles en terre cuite enduits d'huile d'olive dans lesquels est versée une petite quantité d'eau salée, puis le lait est chauffé et coagulé. Le caillé formé est découpé puis consommé tel quel.

***Takammart***

Littéralement «Fromage» en langue *Tamahaq* (Touareg), le *Takammart* est un fromage de la région désertique du Hoggar (Tamanrasset) il est produit par l'introduction d'un morceau de caillette de jeunes chevreaux dans le lait de chèvre. Le caillé obtenu est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte, il est ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé sur une natte à base de tiges de fenouil qui lui transmet un arôme particulier. Les nattes sont, par la suite, exposées au soleil durant deux jours puis placées à l'ombre jusqu'au durcissement du fromage.

***Ibakhbakhane***

Originaire de la région des Aurès, l'*Ibakhbakhane* est produit à partir d'une mixture de *Frik* d'orge (*Marmaz*) et de *L'ben* soumis à une fermentation à des températures inférieures à 20 °C par immersion dans un puits pendant 2 à 5 jours.

***Imadhghass***

Produit dans la région des Aurès, l'*Imadhghass* est produit à partir d'une mixture de *Klila* fraîche et de lait frais. Le produit est consommé comme un dessert.

***Adhghass***

Produit dans la région des Aurès, l'*Adhghass* est fabriqué à partir d'un mélange de colostrum et d'œufs qui est ensuite cuit.

***Aghoughlou***

Fromage fabriqué en Kabylie, il est obtenu à partir de lait frais de vache ou de chèvre coagulé par la sève du figuier.



# Partie 2

***MATERIELS***

***ET***

***METHODES***

## **I ECHANTILLONNAGE DES LAITS**

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

Les échantillons de lait ont été placés dans des flacons en verre stériles, transportés dans des glacières réfrigérées, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Tous les laits ont été analysés dans les 24h. Les échantillons ont été prélevés sur 40 fermes différentes (tableau 19).

Un total de 79 échantillons a été prélevé pendant la traite directement de la mamelle nettoyée ou à partir des bidons. Vingt-trois échantillons ont été prélevés de lait de vache, 38 de lait de brebis, 34 de lait de chèvre, 11 de lait de jument et 5 de lait de chamelle.

A l'exception du lait de chamelle dont les échantillons ont été rapportés de Tamanrasset et Béchar, tous les autres prélèvements ont été faits dans des fermes situées dans l'Ouest Algérien et plus précisément à Tlemcen (ville) et dans les environs de Tlemcen, comme Remchi et Maghnia, et Honay et Porsay.

## **II ISOLEMENT DES LAB MESOPHILES**

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

Les isolements ont été faits à partir des laits crus, ou fermentés spontanément à 30 °C pendant 48 h (96 h pour les laits de chamelle). Lorsqu'il s'agissait de laits fermentés, on s'attendait à sélectionner des souches bien adaptées au milieu lait.

0,1 ml de lait cru ou fermenté ont été cultivés dans un bouillon MRS + vancomycine (20 mg l<sup>-1</sup>) (Mathot et al., 1994) en présence d'une cloche de Durham. Puis, un aliquot des cultures qui ont produit du gaz dans les cloches de Durham a été étalé sur des boîtes MRS + vancomycine (20 mg l<sup>-1</sup>) gélosé.

En parallèle 0,1 ml de lait cru ou fermenté ont été cultivés dans un bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975). Puis un aliquot des tubes ne produisant pas de gaz a été étalé sur des boîtes de M17 gélosé.

Les cultures ont été incubées en aérobiose à 30 °C pendant 24 h.

Le fait d'isoler les souches à partir des bouillons qui produisaient du gaz devait sélectionner les laits qui possédaient au départ une forte proportion de LAB hétérofermentaires strictes. Et inversement lorsqu'il n'y avait pas de gaz produit.

Des colonies ont été isolées puis purifiées par des stries successives sur gélose MRS-vancomycine ou M17, selon le type de milieu dont elles avaient été isolées. L'analyse de quelques colonies seulement sur chaque boîte devait éviter la redondance entre les isolats (isoler plusieurs fois la même souche) devait permettre d'isoler seulement les souches dominantes de chaque boîte.

Les isolats ont été conservés à – 20 °C dans du lait stérile additionné de glycérol (15 %), de glucose (0,5 %) et d'extrait de levure (0,25 %).

### **III EXTRACTION DE L'ADN**

Réalisée à l'URTAL, INRA Poligny, France.

A partir de chaque tube de conservation, une boîte de milieu MRS, M17 ou MSE gélosé (en fonction du milieu d'isolement) a étéensemencée en strie. Les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 30°C. Une colonie de couleur blanche ou légèrement marron bien séparées a été sélectionnée. Elle a été placée à l'aide d'un cure-dent dans 20µl d'eau UHQ (eau ultra haute qualité) stérile placée dans des tubes eppendorf stériles de 0,5 ml. Chaque tube a été agité au vortex pour permettre une dispersion de la colonie dans la goutte d'eau. Tous les tubes ont été congelés pendant 24 h pour permettre la lyse des cellules.

### **IV IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ISOLATS PAR PCR**

Réalisée à l'URTAL, INRA Poligny, France

#### **IV-1 Rep PCR**

##### ***Principe***

La Rep PCR permet d'obtenir une empreinte génétique de l'ADN d'un microorganisme.

La Rep PCR est une technique PCR basée sur l'amplification de fragments de différente taille à partir de l'ADN d'un microorganisme grâce à la présence des mêmes séquences répétées dans les ADN de tous les microorganismes (bactéries, levures, et champignons). Les fragments amplifiés sont de séquence inconnue. Les fragments PCR sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Chaque piste de gel contient l'empreinte génétique d'un ADN sous forme d'un profil électrophorétique.

##### ***Mode opératoire***

La Rep-PCR a été réalisée comme décrit par Berthier et al. (2001) selon le protocole suivant.

Un mélange réactionnel a été réalisé, contenant 1ng/µl d'ADN, 200 µM de chaque nucléotide(ATP, CTP, GTP et TTP), 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, du tampon 1x (Q-BiogenEPQBT025), 0,25 µM de chaque amorce REP1-1R-Dt, et REP2-D, ou 0,25 µM de chaque amorce ERIC1R et ERIC2 ((Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1991) ou 0,5 µM de l'amorce (GTG)<sub>5</sub> et 1 U de Taq polymérase(Q-Biogene EPTQA029).

Les amorces ont pour séquence :

REP1-1R-Dt    IIINCGNCGNCATCNGGC  
 REP2-D        NCGNCTTATCNGGCCTAC.  
 ERIC1R        ATGTAAGCTCCTGGGGATTACACA  
 ERIC2        AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG  
 (GTG)<sub>5</sub>        GTGGTGGTGGTGGTG.

Par commodité, les amorces REP1-1R-Dt, REP2-D et ERIC1R ont été respectivement appelées REP1, REP2 et ERIC1.

La Rep-PCR a été appliquée à l'ADN extrait de chaque isolat (cf. III), mais aussi aux ADN extraits de souches de référence

ATCC 19432 <sup>T</sup>	<i>E. durans</i>
CNRZ 105 <sup>T</sup>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
CIP 103010 <sup>T</sup>	<i>E. mundtii</i>
CNRZ 211 <sup>T</sup>	<i>L. plantarum</i>
CNRZ 77 <sup>T</sup>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
CNRZ 749 <sup>T</sup>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
CNRZ 361 <sup>T</sup>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
ATCC 19433	<i>E. faecalis</i>
CNRZ 142 <sup>T</sup>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
CNRZ 125	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
CIP 102973 <sup>T</sup>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>
ATCC 19434 <sup>T</sup>	<i>E. faecium</i>
CIP 53.48 <sup>T</sup>	<i>E. hirae</i>

L'appareil Gene Amp<sup>®</sup> 9700 PCR (Applied Biosystem) a été utilisé et programmé pour 30 cycles d'amplification de 1 min à 94 °C (phase de dénaturation de l'ADN), 1 min à 40 °C (phase d'hybridation des amorces sur l'ADN cible), 6 min de montée en température jusqu'à 72 °C, 1 min à 72 °C (phase de synthèse de nouveaux brins d'ADN), précédés de 1 min à 94 °C. L'amplification a duré 6 heures.

La séparation des fragments d'ADN amplifiés a été faite sur gel d'agarose à 1 % (agarose spécifique Seakem GTG) par électrophorèse d'environ 6 h sous une tension de 90 V; en plus des échantillons d'ADN, un marqueur de taille (123 pb et ses multiples) était déposé pour permettre ultérieurement la normalisation ultérieure des gels; sur chaque gel, 12 réactions PCR pouvaient être analysées, sachant que le marqueur de taille était placé dans les premier, huitième et quinzième puits. La coloration des gels a été réalisée dans un bain d'eau osmosée et de bromure d'éthidium (BET, Biorad, 92 430 Marnes La Coquette, France) à 0,2 ‰, et la photographie des gels a été réalisée sous UV. Les profils électrophorétiques ont été normalisés après avoir enlevé le bruit de fond, puis comparés à l'aide du logiciel Bionumerics (Applied Maths, Ghent) après concaténation des empreintes

REP1/REP2, ERIC1/ERIC2 et (GTG)<sub>5</sub>. Les fragments dont la taille excédait 2460 pb ont été éliminés de la comparaison à cause de leur mauvaise résolution. La similarité entre les empreintes (position et intensité des bandes) a été calculée sous forme du coefficient de corrélation de Pearson; enfin, un dendrogramme a été créé dans lequel les empreintes ont été classées hiérarchiquement en fonction de leur similarité. Les groupes d'empreintes ayant plus de 40 % d'homologie entre elles ont été nommés A1, A2, etc..

### **Interprétation**

L'expérience acquise à l'URTAL depuis les années 2000 (INRA Poligny, France) aboutit aux mêmes interprétations que celles retrouvées dans la littérature, si tant est que la Rep PCR est réalisée de bout en bout de façon rigoureuse et selon un mode opératoire robuste (F. Berthier, communication personnelle). Les isolats dont les empreintes ont plus de 40 % d'homologie avec l'empreinte d'une souche de référence sont repérés et peuvent être affiliés présomptivement à l'espèce (sous-espèce dans le cas de *Lc. lactis*) à laquelle appartient la souche de référence. Les empreintes différentes sont vraisemblablement des empreintes de souches différentes. Pour éviter de conclure à la présence erronée de deux empreintes différentes, la similarité indiquée sur le dendrogramme est confirmée par l'inspection visuelle des empreintes. Les empreintes sont déclarées similaires lorsqu'elles présentent les mêmes bandes avec la même intensité relative. Les empreintes différentes à l'intérieur de chaque groupe A sont nommées empreinte 1, 2, etc., révélant les génotypes 1, 2, etc..

### **IV-2 PCR spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une sous-espèce**

La PCR spécifique a été appliquée à des isolats représentatifs de chaque groupe Rep-PCR. La PCR spécifique à appliquer a été choisie en fonction de l'affiliation présomptive des isolats à l'issue de la Rep-PCR.

Ainsi, ont été réalisées des PCR spécifiques du genre *Enterococcus*, des espèces du groupe *Lactobacillus plantarum*, et des sous espèces *lactis* et *cremoris* de *Lc. lactis*.

#### **Principe**

La PCR spécifique cible un fragment d'ADN de séquence connue, qui varie en fonction du genre, de l'espèce, ou de la sous-espèce selon la spécificité recherchée. Un seul fragment PCR de taille connue est alors obtenu après amplification avec des amorces bornant le fragment à amplifier. On vérifie la présence et la taille du fragment amplifié par une électrophorèse sur gel d'agarose.

### **Mode opératoire commun**

Le mélange réactionnel était le même pour chaque PCR spécifique et chaque PCR universelle, à l'exception de l'ADN cible et de la paire d'amorces. Ce mélange était le suivant : 1ng/μl d'ADN, 200 μM de chaque nucléotide (ATP, CTP, GTP et TTP), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, du tampon 1x + MgCl<sub>2</sub> (Q-Biogen EPQBT025), et 0,25 μM de chaque amorce.

A partir du même mélange réactionnel contenant tous les éléments, sauf les amorces, plusieurs réactions PCR ont été réalisées :

- Une PCR visant à s'assurer de la présence d'ADN cible avec la paire d'amorce universelle 16/23, qui cible chez tous les ADN bactériens respectivement l'extrémité 3' du gène codant l'ARN ribosomique 16S dans le sens 5' vers 3', et l'extrémité 5' du gène codant l'ARN ribosomique 23S dans le sens 3' vers 5'.

- amorce 16 : GCTGGATCACCTCCTTTC
- amorce 23 : AGTGCCAAGGCATCCACC

- Une PCR visant à détecter la présence de séquence(s) spécifique(s) sur l'ADN cible avec la(les) paire(s) d'amorce(s) spécifique(s) indiquée(s) pour chaque PCR spécifique. Une réaction PCR était mise en œuvre pour chaque paire d'amorces spécifiques.

Ces deux types de réactions PCR doivent être mises en œuvre pour chaque série d'amplification à partir des ADN de référence qui servent de témoins positif ou négatif, et des ADN des isolats qui sont à identifier. L'utilisation des ADN témoin est indispensable. Les profils électrophorétiques obtenus à partir de ces ADN permettent de contrôler que la PCR spécifique s'est déroulée dans de bonnes conditions et servent de référentiel (nombre et taille des fragments PCR qui doivent être obtenus) pour lire les profils électrophorétiques à partir de l'ADN de chaque isolat. Une réponse sans l'ADN témoin n'est pas valide.

Les fragments PCR étaient soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose standard à 1,5 % pendant environ 3 h sous une tension de 90 V; en plus des réactions PCR, un marqueur de taille était déposé; les fragments PCR étaient ensuite révélés par une coloration identique à celle décrite pour la Rep-PCR.

### **PCR spécifique du genre *Enterococcus***

Le mode opératoire a été décrit par Bendimerad et al. (2012). Il utilise une amorce spécifique, *Enc38*, dessinée par Frahm et al. (1998), et une amorce universelle, *conrev23* (Berthier and Ehrlich, 1998).

La paire d'amorce *Enc38/conrev23* permet d'amplifier un fragment à partir des ADN d'*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, et *E. casseliflavus*, c'est-à-dire qu'elle est capable de repérer les espèces d'entérocoques décrites dans les produits laitiers (cf. Chapitre LAB : II-6). Les autres espèces d'entérocoques n'ont pas été testées.

La paire d'amorce *Enc38/conrev23* ne permet pas d'amplifier un fragment à partir des ADN de *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus gallolyticus*.

L'amorce spécifique *Enc38*, qui cible le gène codant l'ARN ribosomique 23S, a pour séquence :

CTCTACCTCCATCATTCT.

L'amorce *conrev23* a la séquence complémentaire de la séquence 23.

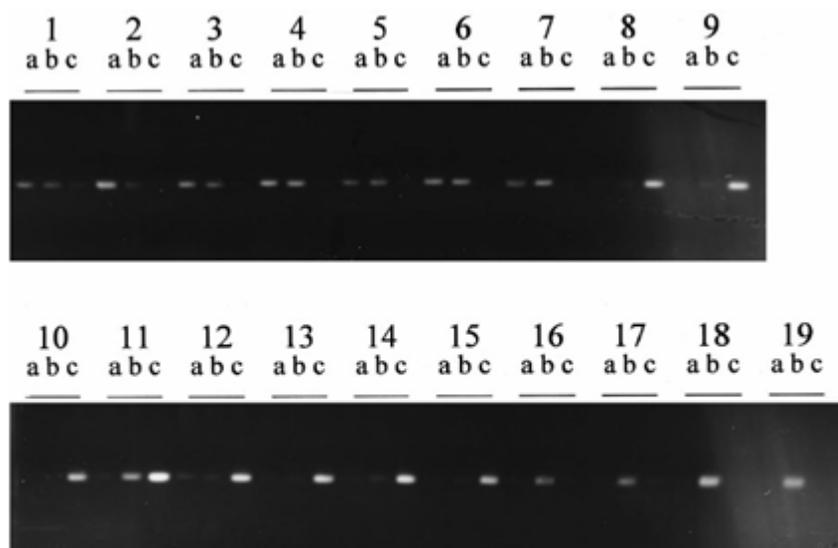
Les ADN des souches de référence CIP53.48<sup>T</sup> (*E. hirae*), ATCC19432<sup>T</sup> (*E. durans*) et ATCC19433<sup>T</sup> (*E. faecalis*) ont servi de témoins positifs; l'ADN de la souche CNRZ 142<sup>T</sup> (*L. lactis* subsp. *lactis*) a été utilisé comme témoin négatif.

Le programme d'amplification était identique à celui décrit plus loin pour la PCR spécifique de l'espèce *L. plantarum*.

Le programme utilisé (durée 2 h) pour l'amplification était un programme de 30 cycles comportant les trois étapes suivantes par cycle : 94 °C pendant 1 min, 53 °C pendant 0 min et 72 °C pendant 1 min.

### PCR spécifique de l'espèce *Lactobacillus plantarum*

Le mode opératoire et l'interprétation ont été ceux décrits par Berthier et Ehrlich (1998). La paire d'amorce *plant/16* n'amplifie que l'ADN de *L. plantarum*, alors que la paire d'amorce *papl/16* amplifie les ADN de *L. plantarum* et de *L. paraplantarum*. *L. paraplantarum* est l'espèce la plus proche phylogéniquement de l'espèce *L. plantarum*. En cas d'amplification, un seul fragment d'environ 220 bp est obtenu (figure 36).



PCR amplifications using 16/Lpl (a), 16/Lpapl (b) and 16/Lpe (c) primer pairs, from DNA of *L. plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup> (1), *L. plantarum* CNRZ 184 to *L. plantarum* CNRZ 1246 (2 to 7), *L. pentosus* CNRZ 1537 to *L. pentosus* CNRZ 1570 (8 to 14), *L. pentosus* 8041<sup>T</sup> (15), *L. paraplantarum* CNRZ 1885<sup>T</sup> (16) and *L. paraplantarum* CNRZ 1886 to *L. paraplantarum* CNRZ 1887 (17 to 19). <sup>T</sup>, type strain.

**Figure 36** : Amplification des ADN de *L. plantarum* et *L. paraplantarum* avec les paires d'aporeses 16/Lpapl(=*papl*) et 16/Lpl(=*plant*) (Berthier et Ehrlich, 1998).

Les ADN de référence étaient : CNRZ 211<sup>T</sup> (*L. plantarum*), témoin positif, et CNRZ 1885<sup>T</sup> (*L. paraplantarum*), témoin négatif.

Les séquences des amorces spécifiques, qui ciblent la grande séquence intergénique 16S-23S, étaient :

- amorce *plant* : ATGAGGTATTCAACTTATG pour *L. plantarum*
- amorce *papl* : ATGAGGTATTCAACTTATT pour *L. paraplantarum*.

Ces amorces ont été associées à l'amorce universelle 16.

La séquence de l'amorce universelle, qui cible la séquence du gène codant l'ARN ribosomique 16S, était :

amorce 16 : GCTGGATCACCTCCTTTC

Le programme utilisé (durée 2 h) pour l'amplification était un programme de 30 cycles comportant les étapes suivantes/cycle : 94 °C pendant 1min, 53 °C pendant 0 min et 72 °C pendant 1min. Il était identique à celui utilisé pour la PCR spécifique du genre *Enterococcus*.

### **PCR spécifique des sous espèces *lactis* et *cremoris* de *L. lactis***

Le couple d'amorces spécifiques *LHis 5F* et *LHis 6F*, le mode opératoire et l'interprétation décrits par Beimfohr et al. (1997) ont été utilisés.

Ces amorces sont issues de la séquence de l'opéron histidine décarboxylase :

- amorce *Lhis 5F* : CTTTCGTTATGATTTTACA
- amorce *Lhis 6F* : AATATCAACAATTCCATG

Le couple d'amorces *Lhis6F* et *Lhis5F* permet de distinguer *Lc.lactis* subsp. *lactis/hordniae* de *Lc lactis* subsp.*cremoris*. L'amplification de l'ADN de *Lc.lactis* subsp. *lactis/hordniae* donne un fragment de 934 pb, alors que l'amplification de l'ADN de *Lc lactis* subsp.*cremoris* donne un fragment de 1149 pb.

A côté de l'ADN des isolats, trois ADN témoins ont été amplifiés: ceux des souches CNRZ 142<sup>T</sup> (*Lc.lactis* subsp. *lactis*), CNRZ 105<sup>T</sup> (*Lc lactis* subsp.*cremoris*) et CNRZ 125 (*Lc.lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*).

Les ADN ont été amplifiés selon un programme de 30 cycles comprenant les trois étapes suivantes par cycle : 94 °C pendant 10 s, 46 °C pendant 1 min 30 s et 72 °C pendant 2 min.

## **V- CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS**

### **V.1 Caractères morphologiques**

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

Le type de morphologie des isolats a été déterminé après avoir fixé les cellules, les avoir colorées avec les colorants de Gram, puis les avoir observées au microscope optique au grossissement 100 avec immersion.

La mobilité des isolats a été recherchée par une observation microscopique à l'état frais en utilisant le grossissement 100 avec immersion.

## **V.2 Caractères physiologiques**

### ***Croissance à différentes températures***

Réalisée à l'URTAL, INRA Poligny, France.

La capacité des isolats lactiques à croître entre 10 °C et 40 °C a été testée après les avoir ensemencés en strie sur les milieux de cultures gélosés M17 ou MRS, puis les avoir incubés en aérobiose pendant 24h à soit 10 °C, soit 25 °C, soit 30 °C, soit 37 °C et soit 40 °C. La lecture des résultats a consisté à observer à l'œil nu la présence (résultat positif) ou l'absence (résultat négatif) de colonies à la surface des géloses.

### ***Croissance sur milieu salé***

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

La capacité des isolats lactiques à croître sur des milieux salés a été testée en MRS ou M17 gélosés supplémentés par soit 2,5 %, soit 3,0 %, soit 4 % et soit 6,5 % (p / v) de NaCl. Les milieux ont été ensemencés en stries puis incubés en aérobiose à 30 °C pendant 48 h avec une lecture à 24 h. La lecture des résultats a consisté à détecter la présence (résultat +) ou l'absence (résultat -) de colonies à la surface des géloses.

## **V.3 Caractères biochimiques**

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

### ***Test de la catalase***

La dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène par la catalase a été testée en mettant en contact une colonie bactérienne ayant poussé sur MRS ou M17 gélosé avec une goutte d'eau oxygénée (0,02 ml). L'absence de bulles de gaz a traduit l'absence d'activité catalase.

### ***Type fermentaire***

Ce test permet de discriminer les isolats lactiques qui sont homofermentaires, stricts ou facultatifs, de ceux qui sont hétérofermentaires stricts. Il a été réalisé en cultivant les isolats sur milieu MRS ou M17 (selon le milieu sur lequel il avait été isolé) en aérobiose à 30 °C pendant 48 h et en plaçant une cloche de Durham. Une lecture a été faite à 24h. En cas d'absence de gaz dans la cloche, l'incubation a été poursuivie 24 h supplémentaires. Les isolats qui ont produit du gaz dans les cloches ont été notés *hétérofermentaires stricts*; les isolats qui n'ont pas produit de gaz dans les cloches ont été notés *homofermentaires*.

### ***Voie des acides mixtes***

Ce test a été utilisé pour mettre en évidence la voie des acides mixtes pour les coliformes présomptifs. Un bouillon Clark et Lubs a été ensemencé à partir d'un bouillon BLBVB positif (cf. § VII-1), puis incubé 24 h à 37 °C. Quelques gouttes de rouge de méthyle

ont été alors rajoutées. Les cultures pour lesquels le milieu a viré du jaune au rouge, témoignant de la production des acides mixtes, ont été notés voie des acides mixtes « + ».

#### **Utilisation du citrate**

La capacité des isolats lactiques à utiliser le citrate a été testé après ensemencement du milieu liquide KMK. Les isolats dont les colonies apparaissaient de couleur bleue après 48 h d'incubation en aérobiose à 30 °C ont été notés « + » pour l'utilisation du citrate (Kempler et McKay 1980).

La capacité des coliformes présomptifs à utiliser le citrate a été testé sur le milieu en tube incliné « citrate de Simmons », ensemencé en stries en surface à partir d'un bouillon BLBVB positif (cf. § VII-1), puis incubé une nuit à 37 °C. Les cultures pour lesquelles le milieu est passé du vert au bleu, témoignant de la dégradation du citrate, ont été notées citrate « + ».

#### **Hydrolyse de l'arginine**

Ce test a été réalisé par ensemencement en stries d'une colonie sur le milieu solide M16BCP et incubation en aérobiose à 30 °C pendant 24 h. Les isolats lactiques dont les colonies se distinguaient par leur couleur blanche ont été notés « + » pour l'utilisation de l'arginine (Thomas, 1973).

#### **Recherche de protéase**

L'isolat lactique a été ensemencé sous forme de spot sur une gélose YMA (Yeast milk agar) riche en lait (voir composition en annexe) incubée en aérobiose pendant 24 h à 30 °C; les isolats dont les colonies étaient entourées d'une zone transparente (correspondant à une hydrolyse des caséines) ont été notés (+) pour la présence de protéase.

#### **Production de dextrane**

Ce test a été réalisé pour les isolats appartenant au genre *Leuconostoc*. Ces derniers ont été ensemencé en strie sur du milieu MRS saccharosé (50g l<sup>-1</sup> de saccharose). Après 24 h d'incubation en aérobiose à 30 °C les isolats dont les colonies avaient un aspect muqueux ont été notés « + » pour la production de dextrane (Dellaglio et al., 1994), (Bauer et al, 2009)

#### **Production d'acétoïne**

La capacité des isolats lactiques à produire de l'acétoïne a été recherchée après croissance des isolats dans du lait écrémé stérilisé incubé en aérobiose à 30 °C pendant 24 h; deux gouttes de VPI et deux gouttes de VPII (alpha-naphthol and potassium hydroxide, réactifs I et II de Voges Proskauer) ont été rajoutés dans le lait. Les isolats qui ont produit un anneau rose à la surface du lait ont été notés « + » pour la production d'acétoïne.

La capacité des coliformes présomptifs à produire de l'acétoïne a été recherchée après croissance des coliformes présomptifs dans un bouillon Clark et Lubs, ensemencé à partir d'un bouillon BLBVB positif (cf. § VII-1). Après une nuit d'incubation à 37 C, deux

gouttes du réactif VPI et deux gouttes du réactif VP II (réactifs de Voges Proskauer) ont été rajoutées au bouillon. Les cultures qui ont produit un anneau rose à la surface du lait ont été notés « + » pour la production d'acétoïne.

#### ***Production d'indole***

La capacité des coliformes présomptifs à produire de l'indole a été recherchée après culture des coliformes présomptifs dans une eau peptonée exempt d'indole,ensemencée par un aliquot de milieu BLBVB positif (cf. § VII-1). Après 24 h d'incubation à 37 °C, quelques gouttes du réactif de Kovacs ont été rajoutées. Les cultures qui ont produit un anneau violet, témoin de la production d'indole à partir du tryptophane, ont été notés indole « + ».

#### ***Utilisation des sucres***

La production d'acide à partir d'un sucre par les isolats lactiques a été attestée de l'utilisation de ce sucre. Après revivification des isolats en milieux MRS ou M17 liquides pendant 24 h à 30 °C, les cellules ont été récupérées sous forme de culot par centrifugation à 400 tours/minute pendant 10 min. Deux lavages successifs du culot avec 5 ml d'eau physiologique stérile ont été réalisés. 10 ml du milieu liquide MRS ou M17 sans sucre ont été ensemencés par 100 µl de la suspension bactérienne précédemment obtenue, puis complétés par quelques gouttes d'une solution aqueuse du sucre à tester (à 10 g l<sup>-1</sup>) et quelques gouttes d'une solution aqueuse de pourpre de bromocresol (à 0.04 l g<sup>-1</sup>). Une atmosphère anaérobie a été créée par l'addition d'une couche de paraffine à la surface, puis les tubes ont été incubés à 30 °C pendant 24 h. L'utilisation du sucre a été notée « + » lorsque le milieu avait viré au jaune.

L'utilisation du glucose, lactose et saccharose par les coliformes présomptifs a été testée sur le milieu solide TSI, en gélose inclinée dans un tube à essai. La partie inférieure, non inclinée, contient du glucose ; la partie inclinée contenant le lactose et le saccharose. Une piqûre centrale, puis un ensemencement en surface, permettent de voir les résultats après 24 h à 37 °C. L'utilisation du sucre a été notée « + » lorsque le milieu avait viré au jaune.

#### **V-4 Capacité à acidifier le lait**

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie, et à l'URTAL, INRA Poligny, France

Cette capacité a été étudiée sur du lait écrémé reconstitué.

#### ***Préparation des laits***

Pour des raisons de commodité, ce lait n'a pas été préparé à partir de la même poudre et selon le même mode opératoire en France et en Algérie.

- Mode opératoire 1 (Université de Tlemcen, Algérie)

Du lait écrémé en poudre (Régilait)\_(poudre produite en France (Rn6-Les Jonchets, 71118 Saint Martin. Belle Roche) et conditionnée en Algérie) a été mélangé à un litre d'eau distillée (120 g/l litre). Puis, 10 ml de lait ainsi préparé ont été mis dans un tube à essai, et autoclavés pendant 15 min à 110 °C. Après refroidissement, le tube a été inoculé par 0,5 ml d'une culture de l'isolat sur milieu MRS ou M17 selon le milieu d'origine de l'isolat.

- Mode opératoire 2 (INRA Poligny, France)

10 ml de lait écrémé (poudre de lait provenant de Laiterie de Montaigu-SAS Sabourin, France), reconstitué avec de l'eau osmosée, ont été stérilisés 20 min à 120 °C, puis ont été inoculés par  $10^6$  à  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> d'un isolat cultivé en milieux liquides M17 (lactocoques) ou MRS (leuconostoc).

### **Mesure de l'acidité**

L'acide produit par les isolats a été mesuré selon la méthode normalisée au NaOH (N/9) en ajoutant 5 gouttes de phénophtaleine comme indicateur coloré. L'acidité titrable du lait a été exprimée en degrés Dornic (°D) puis convertie en g/l selon la formule : 1ml de NaOH correspond à 10 °D et un degré Dornic correspond à 0,01 % d'acide lactique

### **Capacité à coaguler le lait en 18 H**

Ce test a permis de repérer les isolats qui ont été capables de coaguler le lait à 30 °C après une incubation en aérobiose de 18 h; ils ont été notés *isolats à coagulation rapide*. Les autres isolats ont été notés *isolats à coagulation lente*.

Le lait a été préparé selon le mode opératoire 1. Le tube de laitensemencé a été incubé en aérobiose à 30 °C pendant 18 h; si le lait n'était pas coagulé après 18 h d'incubation, l'incubation était poursuivie jusqu'à 24 h.

### **Suivi de l'évolution du pH et des quantités d'acide produites en fonction du temps à 30°C**

Le lait a été préparé selon le mode opératoire 1.

Dans une première série d'essai, les valeurs de pH ont été mesurées à 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 18 h et 24 h.

Dans une deuxième série d'essai, trois modalités par isolat ont été testées, à savoir une supplémentation du lait par 0,1 %, 0,3 % et 0,5% d'extrait de levure; de plus, l'acide produit a été mesuré aux mêmes stades que les valeurs de pH (identiques à ceux de la première série).

Pour chaque isolat, les graphiques représentant les cinétiques des quantités d'acide produit et des valeurs du pH ont été établis, ainsi que ceux représentant les valeurs de pH en fonction des quantités d'acide produites. Ces derniers ne tiennent donc plus compte de la variable temps. Les graphiques qui présentaient des allures similaires pour plusieurs isolats ont été superposés pour simplifier la présentation. Les graphiques pour chaque isolat sont présentés en annexe I

### **Variation des valeurs de pH en fonction de la température d'incubation**

Le lait a été préparé selon le mode opératoire 2.

Seuls les isolats identifiés par des méthodes moléculaires comme appartenant aux espèces *L. lactis* et *L. mesenteroides* ont été testés. Les souches type de ces espèces ont été suivies en parallèle.

Le pH de la culture en lait a été mesuré à 24 h, 48 h et 72 h d'une incubation en aérobiose soit à 25 °C, soit à 30 °C, soit à 37 °C, soit à 42 °C et soit à 50 °C. A 48 h, les valeurs de pH étaient déjà à leur minimum pour tous les isolats et souches de référence. Ce sont donc les valeurs à 48 h qui ont servi à la comparaison.

Lorsque le lait a été incubé à 30°C, une modalité avec la présence d'extrait de levures à 0,1 % a été ajoutée.

## **VI ESSAI DE FABRICATION DE FROMAGES TYPE *Jben***

Réalisé au laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université Tlemcen, Algérie.

Le but était d'essayer de fabriquer des fromages type *Jben* en utilisant des levains acidifiants choisis parmi les isolats lactiques préalablement isolés et caractérisés, puis de comparer leurs caractéristiques sensorielles avec celles d'un fromage *Jben* commercial, ou fabriqué avec un levain utilisé en fromagerie. Les fabrications ont été faites avant l'identification moléculaire des isolats.

Se reporter à la figure 35 pour replacer ce type de technologie parmi les technologies appliquées pour fabriquer des produits laitiers algériens.

### **VI-1 Préparation des levains**

Quatre isolats (15, 22 ou 23\*, 06, 18 ou 19 ou 20\*; \*, il existe une incertitude sur le numéro) appartenant d'après l'identification phénotypique à l'espèce *L. lactis* ont été utilisés pour composer les levains « S » et « C ». L'identification moléculaire a été réalisée après les essais de fabrication. L'isolat 15 est finalement resté un isolat *L. lactis* subsp. *lactis*, l'isolat 06 est devenu un isolat *L. mesenteroides* subsp. *inconnue*, et les isolats 18-23 sont devenus des isolats *E. durans*. Deux types de levains ont été préparés : l'un, appelé levain « C », contenait les quatre isolats lactiques, à savoir les espèces/sous-espèces *L. lactis* subsp. *lactis*, *E. hirae* et *E. durans* ; l'autre, appelé levain « S », ne contenait que trois des quatre isolats (l'isolat 15 n'a pas été rajouté), à savoir les espèces *E. hirae* et *E. durans*.

Un levain, appelé levain « I » et utilisé en fabrication à la laiterie de Tlemcen, a été également préparé. Le même protocole a été suivi, sauf que les isolats lactiques ont été remplacés par un levain lactique sous forme lyophilisée cédé par la laiterie de Tlemcen

(code SMADL77, mésophiles hétérofermentaires, Marschall. Rhodia). Ce levain contient d'après le fournisseur *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, et *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

100 g de poudre de lait (Régilait) ont été ajoutées à 900 ml d'eau distillée thermisée à 45 °C pendant quelques minutes. Après dissolution, le lait reconstitué a été pasteurisé à 90 °C pendant 30 min puis refroidi entre 25 et 30 °C. Le lait stérile a été partagé ensuite en deux parties de 500 ml chacune qui ont étéensemencées par 1 ml d'une culture en M17 de chaque isolat constituant le levain « S » et « C ». Les laitsensemencés ont été incubés pendant 16 à 18 h à 30 °C afin d'obtenir une acidité de 80 à 90 °D correspondant à un pH de 4.5 à 5.0. Les deux cultures de levains ont été ensuite refroidies à 4 °C afin d'éviter l'augmentation de l'acidité.

## VI-2 Fabrication proprement dite

Les cultures de levain ont été réchauffées sur un feu pendant quelques minutes jusqu'à la température de 30 °C puis 45 ml d'une des cultures a servi àensemencer 5 litres de lait pasteurisé partiellement écrémé (acheté dans le commerce sous forme liquide). Les deux types de fromage « S » et « C », ont été fabriqués en parallèle. Le fromage « I » a été fabriqué séparément, moins de 48 h plus tard.

Les laitsensemencés ont été incubés à 30°C pendant 24 h jusqu'à obtention d'un caillé. L'acidité titrable a été mesurée toutes les deux heures. Quelques gouttes de présure animale ont été ajoutées à 2 h de fabrication. La présure lyophilisée, fournie par la laiterie de Tlemcen, a été au préalable diluée dans de l'eau distillée à raison de 2,5 g dans 50 ml d'eau. Après 24 h de fabrication, le caillé a été mis dans un sac d'égouttage suspendu dans une chambre froide à 6 °C pendant 24 h.

## VII- ANALYSE DES FROMAGES

### VII-1 Analyses microbiologiques

Les germes recherchés et dénombrés ont été :

- la **microflore totale** sur gélose nutritive (composition en annexe IV) après 24 h à 37 °C.
- les **entérobactéries** sur milieu Mac Conkey solide (annexe IV) après 24 h à 37 °C.
- les **coliformes totaux** recherchés sur bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) (Dunham et Schoenlein, 1926, (<http://microbioalimentaire.dynamicforum.net/t2-b>) (composition du milieu en annexe IV) après incubation à 37 °C pendant 24 h puis dénombrés ensuite par la méthode du NPP (norme NF ISO 4831 (V 08 -016) selon la table de Mac Credy (technique décrite en annexe II). Enterobacter a été détecté par le test IMVIC (annexe II).

- les **entérocoques** recherchés sur bouillon Rothe qui est un test présomptif puis EVA Litsky pour le test confirmatif (annexe IV). Ces deux milieux ont été incubés à 37 °C pendant 24 h,

- les **Salmonella** recherchées sur milieu solide SS après enrichissement sur bouillon au sélénite SFB (annexe IV). les milieux SS et SFB ont été incubés à 37 °C pendant 24 h,

- les **Staphylococcus aureus** recherchés sur milieu Chapman Mannitol après incubation à 37 °C pendant 24 h et après enrichissement dans le bouillon Giolitti et Cantoni (annexe IV) pendant 24 h à 37 °C.

- et les spores de **Clostridia** recherchées sur gélose viande foie (VF) additionnée d'alun de fer et de sulfite de sodium (annexe IV) après avoir éliminé la forme végétative par un chauffage à 80 °C pendant 10 min.

Pour tous les germes recherchés et cités ci-dessus, l'incubation a été prolongée jusqu'à 48 h en cas d'absence de germes à 24 h.

## VII-2 Analyses physico-chimiques

Réalisées dans le Laboratoire de microbiologie (actuellement LAMAABE), Université de Tlemcen, Algérie, sauf extrait sec et matière grasse, réalisés au « laboratoire des substances naturelles », Université de Tlemcen, Algérie. Après 24h d'égouttage, 4 échantillons de chacun des fromages « S » « I » ont été analysés.

### **Détermination du poids**

Après égouttage, le fromage a été mis dans un pot puis pesé à l'aide d'une balance électronique.

### **Mesure de la température**

Elle a été mesurée à l'aide d'un thermomètre qui a été introduit à différents endroits du fromage.

### **Acidité titrable**

L'acidité titrable a été mesurée de la manière suivante : à 90 ml d'eau distillée ont été ajoutés 10 g de fromage, puis 10 ml de cette suspension a été titrée par de la soude N/9. Le résultat a été exprimé en degré Dornic par gramme de fromage (°D/g) (1 ml de soude correspondant à 10°D).

### **Détermination de l'extrait sec total et de l'humidité**

La méthode a consisté à mettre 5 g de fromage dans une capsule d'étuvage placée à l'étuve à une température comprise entre 101 et 105 °C pendant 3 heures. Les capsules ont été ensuite transférées dans un dessiccateur pendant quelques minutes le temps qu'elles refroidissent et atteignent la température ambiante, puis elles ont été pesées.

**Le résultat a été calculé selon la formule :**

$$EST = (P_3 - P_1) / (P_2 - P_1)$$

avec  $P_1$ , le poids de la capsule vide ;  $P_2$ , le poids de la capsule + du fromage avant étuvage ;  $P_3$ , le poids de la capsule plus celui du fromage après étuvage et dessiccation

Le taux d'humidité (Hm) a été ensuite calculé selon la formule suivante :

$$Hm = 100 - EST$$

### **Détermination de la teneur en matière grasse et du gras/sec**

Elle a été faite par la méthode acide butyrométrique type Gerber.

La matière grasse ayant une densité inférieure à celle des autres composants est séparée par centrifugation en utilisant un butyromètre. D'abord il y a dissolution des protéines par l'acide sulfurique, puis ensuite séparation de la matière grasse par centrifugation. Le résultat est donné en pourcentage.

Trois grammes de fromage ont été pesés et introduits dans la panse du butyromètre, le bouchon a été fixé au col, puis 10 ml d'acide sulfurique, 1 ml d'alcool isoamylique et 8 ml d'eau distillée ont été ajoutés. Le butyromètre a été bouché afin de pouvoir agiter énergiquement et retourner plusieurs fois le butyromètre pendant une trentaine de secondes afin de mélanger les phases. Puis une centrifugation a été réalisée pendant cinq minutes à 1000 tours/minute. La lecture du pourcentage de matière grasse a été faite directement grâce aux graduations présentes sur le butyromètre.

Le Gras/Sec a été ensuite calculé selon la formule:

$$G/S = (MG/ EST) \times 100$$

### **VII-3-Evaluation sensorielle**

Seize personnes choisies au hasard parmi des étudiants et du personnel de l'Université de Tlemcen dans une tranche d'âge allant de 18 à 60 ans ont accepté de participer aux tests sensoriels. Nous leur avons fourni les échantillons et un questionnaire que chacun devait remplir (fiche du questionnaire en annexe III).

#### **Objectif**

L'évaluation a consisté à comparer trois fromages :

- un des fromages fabriqués avec des souches isolées au laboratoire, le fromage « S »
- le fromage « I » fabriqué au laboratoire avec des ferments commerciaux.
- et un fromage de référence « R » fabriqué par l'unité Danone Djurdjura (Alger SPA)

Le fromage « C n'a pas été considéré car il présentait un caillé anormal (cf. résultats).

En vue de cette évaluation, deux types de tests ont été choisis :

- *L'épreuve triangulaire*
- *L'épreuve de classement.*

### ***Epreuve triangulaire***

Elle s'est déroulée selon la Norme ISO 4120.1983. Elle a consisté à présenter deux échantillons de fromage dont l'un a été répété ; le dégustateur a donc reçu trois échantillons codés et il a été invité à déterminer le fromage répété.

Deux épreuves triangulaires ont été effectuées, la première relative à l'aspect externe, et la seconde au goût.

Les échantillons ont été présentés selon les positions suivantes :

(R-R-I), (S-S-I), (I-I-R), (R-R-S), (I-I-S) et (S-S-R)

S: Fromage fabriqué au laboratoire avec des souches isolées au laboratoire

I : Fromage fabriqué au laboratoire avec des souches commerciales

R : Fromage de référence fabriqué par Danone

En toute rigueur, il a manqué les combinaisons suivantes :

SIS ISI, SRS, RSR, IRI, et RIR, à cause d'une quantité de fromage insuffisante

La décision statistique a été prise après calcul d'une valeur  $\mu$  obtenue par approximation d'une loi binomiale

$$\mu = (|3x - n| - 1,5) / \sqrt{2n}$$

$n$  : nombre de répétitions (nombre de sujets quand chaque sujet réalise une seule épreuve)

$x$  : nombre de réponses correctes observées

Pour être valide, l'approximation suppose que  $n$  fois  $1/3$  soit supérieur à 5 (donc  $n > 15$ ), ce qui est le cas dans l'étude ( $n=16$ ).

-Si  $\mu$  observée  $> 1,64$  les différences sont significatives à 5%

-Si  $\mu$  observée  $> 2,33$  les différences sont significatives à 1 %

-Si  $\mu$  observée  $> 2,81$  les différences sont significatives à 1 ‰

### ***Test de classement***

Il a consisté à présenter des échantillons des fromages I, R, et S et à demander au sujet de les classer par ordre d'intensité ou degré pour une caractéristique donnée. Celui qui avait la note la plus élevée pour une caractéristique était noté '1', celui qui avait la note la plus basse était noté '3', et celui qui avait la note intermédiaire était noté '2' (annexe III).

La réponse obtenue a été analysée au moyen d'une analyse de variance de Friedman. Ce test distribue les données en un tableau à double entrée ayant  $N$  rangées et  $k$  colonnes. Les rangées représentent les différents sujets (dégustateurs) et les colonnes les différentes conditions (fromages). Les données sont rangées. La détermination des rangs se fait pour chaque rangée séparément. Donc pour  $k$  conditions, les rangs de chaque rangée se répartissent entre 1 et  $k$ . Le test détermine si les différentes colonnes de rangs proviennent de la même population. On calcule une valeur statistique,  $C^2_r$ . La distribution

d'échantillonnage du  $c^2r$  est une approximation de la distribution du khi carré à  $k - 1$  degré de liberté.

$$\begin{aligned} \bar{r}_{.j} &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_{ij} \\ \bar{r} &= \frac{1}{nk} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k r_{ij} \\ SS_t &= n \sum_{j=1}^k (\bar{r}_{.j} - \bar{r})^2 \\ SS_e &= \frac{1}{n(k-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (r_{ij} - \bar{r})^2 \\ \mathbf{C}^2\mathbf{r} &= \mathbf{SS}_t / \mathbf{SS}_e \end{aligned}$$

Avec

$n$  : nombre de sujets (nombre de lignes)

$k$  : Nombre de fromages (nombre de colonne)

$dl$  : degrés de liberté =  $k-1$

Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs théoriques lues au même degré de liberté sur la table donnée en annexe III

Khi2 théorique à 1 % = 9,21 ; à 5 % = 5,99

Nous avons réalisé quatre épreuves de classement :

- la première pour la consistance
- la deuxième pour l'acidité
- la troisième pour l'arôme
- La quatrième pour l'appréciation générale

Les fiches du questionnaire concernant ces tests sont donnés en annexe III.

Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs théoriques lues au même degré de liberté sur la table donnée en annexe III. Si la valeur du  $c^2r$  calculée par la formule est égale ou supérieure à celle donnée dans la table pour un niveau de signification et un degré de liberté donnés, les sommes des rangs des diverses colonnes diffèrent significativement et l'hypothèse  $H_0$  peut être rejetée (annexe III).



# Partie 3

***RESULTATS***

***ET***

***INTERPRETATIONS***

## I-ISOLATS LACTIQUES

### I-1 Sources des isolats

Quatre-vingt-quatre isolats catalase négative à Gram positif, dont 81 cocci, ont été obtenus à partir de 79 échantillons représentant 40 exploitations (tableau 19). 38% provenaient de lait cru de vache, de brebis et de lait de chèvre, et 62% de laits fermentés de brebis, chèvre, jument et chamelle. Parmi les cocci, 62% ont été isolés sur des géloses MRS-vancomycine et 38% sur des géloses M17. Les isolats appartenant au genre *Enterococcus* ont été collectés sur des géloses MRS et M17, tandis que ceux appartenant au genre *Lactococcus* l'ont été sur des géloses M17, et au genre *Leuconostoc* sur des géloses MRS.

**Tableau 19 : Sources des isolats (1/3)**

Code	Source	Lieu géographique	Milieu d'isolement	Milieu de culture	Traitement après traite
02	pis et vache bidon	Tlemcen	MRS+Vanc.	MRS	Cru
04	Pis et vache bidon	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Cru
06	pis et vache bidon	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Cru
09	pis et vache bidon	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Cru
14	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
15	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
16	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
17	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
18	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
19	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
20	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
22	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
23	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
24	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
25	pis vache	Tlemcen	M17	M17	Cru
26	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
27	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
28	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
29	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
30	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
32	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
33	pis brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté

**Tableau 19 : Sources des isolats (2/3)**

34	pis	brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
35	pis	brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
36	pis	brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
37	pis	brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
38	pis	brebis	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
39	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
42	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
43	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
45	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
46	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
49	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
50	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
51	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
52	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
53	pis et bidon	brebis	Remchi et Maghnia	M17	M17	Cru
64	pis	chèvre	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
65	pis	Chèvre	Tlemcen	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
66	pis	chèvre	Tlemcen,	M17	M17	Cru
67	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
68	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
69	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
71	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
72	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
73	pis	chèvre	Tlemcen	M17	M17	Cru
76	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
79	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
81	pis	jument	Honnay et Porsay	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
82	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
83	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
86	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
87	pis	jument	Honnay et Porsey	MRS+Vanc	MSE	Fermenté
89	pis	jument	Tlemcen /jument	M17	M17	Fermenté
90	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
91	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
92	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
93	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
94	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
95	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté

**Tableau 19 : Sources des isolats (3/3)**

96	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
97	pis	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
98	<b>pis</b>	jument	Tlemcen	M17	M17	Fermenté
99	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS +Vanc	ME	Fermenté
102	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	MRS	Fermenté
103	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+Vanc	ME	Fermenté
104	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS +Vanc	ME	Fermenté
105	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+Vanc	MRS	Fermenté
106	pis	chameau	Bechar et Tamanraset	MRS+ Vanc	ME	Fermenté
106 bis	pis		Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	MRS	Fermenté
107	pis	chameau	Bechar et Tamanraset	MRS+ Vanc	ME	Fermenté
108	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	ME	Fermenté
109	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	MRS	Fermenté
110	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	MRS	Fermenté
111	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	ME	Fermenté
112	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	MRS	Fermenté
113	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+ Vanc	ME	Fermenté
115	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	M17	M17	Fermenté
117	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	M17	M17	Fermenté
118	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	M17	M17	Fermenté
119	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	M17	M17	Fermenté
135	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS+Vanc	M17	Fermenté
136	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	MRS +Vanc	M17	Fermenté
137	pis	chameau	Béchar et Tamanraset	M17	M17	Fermenté
<b>Total = 84</b>						

### I-2 Identification moléculaire des isolats

Elle a été réalisée avec des méthodes moléculaires basées sur l'analyse des séquences d'ADN par des techniques PCR, Rep-PCR et PCR spécifique. La Rep-PCR a nécessité l'utilisation de 3 amorces différentes, REP, ERIC et GTG<sub>5</sub> pour regrouper sans ambiguïté tous les isolats.

Ainsi, 90 % des isolats (77 sur 84) ont été affiliés avec certitude à sept espèces et sous-espèces de LAB mésophiles établies appartenant à quatre genres, à savoir : *Enterococcus* (48 isolats; *E. hirae* (21), *E. durans* (13), *E. faecalis* (7), *E. sp.* (7), *Leuconostoc* (15 isolats, *L. mesenteroides*), *Lactococcus* (11 isolats, *L. lactis subsp. lactis*) et *Lactobacillus* (3 isolats, *Lb. plantarum*).

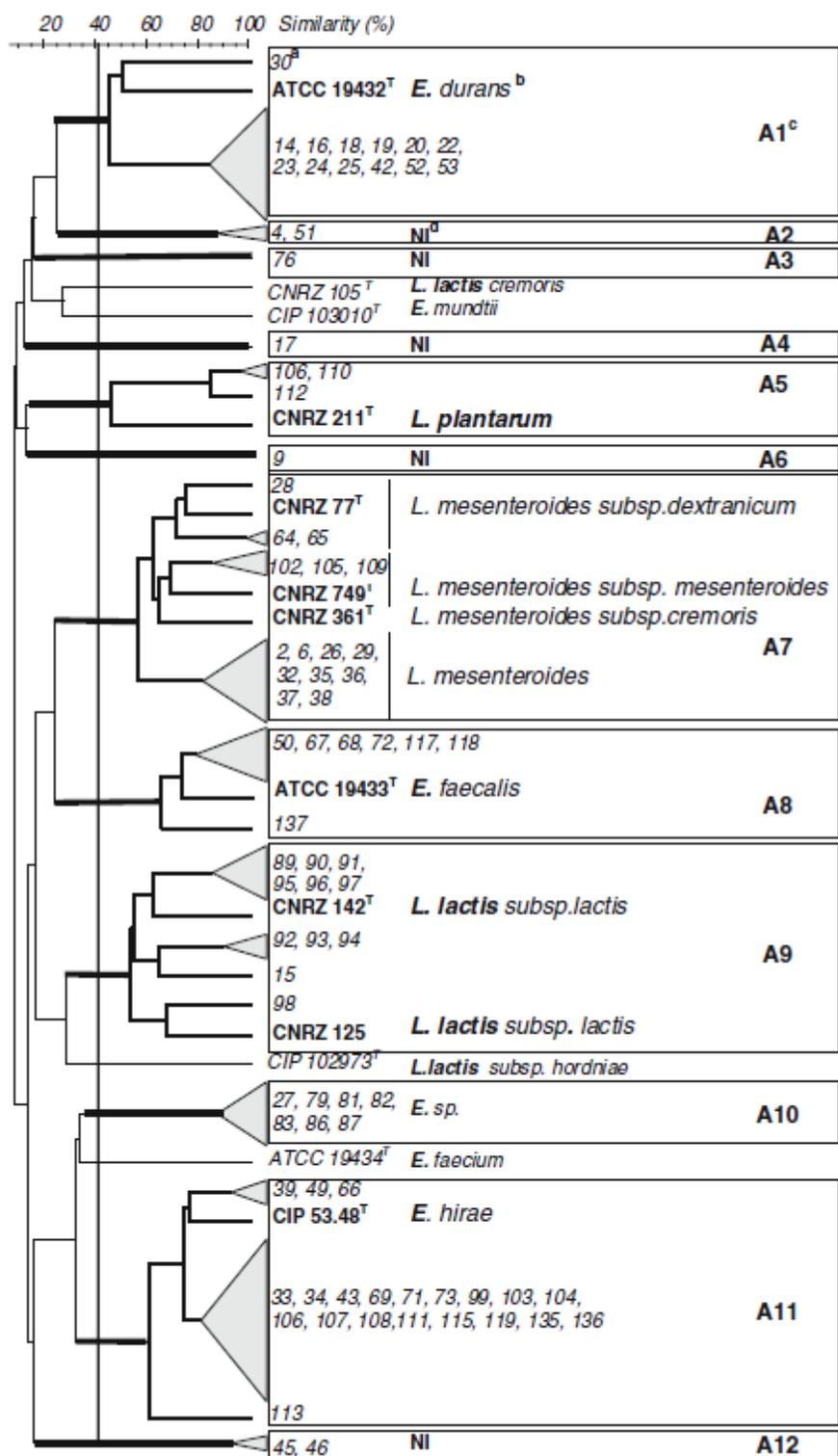
D'abord, les 84 isolats ont été regroupés en douze groupes (A1-A12) (figure 37) après classification hiérarchique de leurs profils Rep-PCR. Chaque profil résultait de la combinaison des profils de fragments PCR obtenus avec les amorces REP, ERIC et (GTG)<sub>5</sub>. Chaque groupe comprenait des profils Rep-PCR homologues entre eux à plus de 40 %. Soixante dix isolats partagent plus de 40% d'homologie avec les profils de six espèces et sous-espèces de LAB établies : *L. mesenteroides*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecalis*, *Lc. lactis subsp. lactis*, et *Lb. plantarum*. Cela suggérait fortement une appartenance de ces isolats à une de ces espèces. Les sept isolats du groupe A10 avaient des profils Rep-PCR proches de ceux d'*E. faecium* et *E. hirae*, mais présentant cependant moins de 40% d'homologie avec ceux-ci ; c'est pour cela qu'ils ont été nommés *Enterococcus sp.*

Puis, les identifications présomptives d'*Enterococcus*, *Lb. plantarum* et *Lc. lactis subsp. lactis* basées sur leurs profils Rep-PCR ont été confirmées par PCR spécifique de ces genres, espèces et sous-espèce, sur des ADN d'isolats représentatifs des groupes Rep les contenant, à savoir les groupes A1, A5, A8 et A11. Ainsi, les espèces et sous-espèces génétiquement proches de *Lb. plantarum*, à savoir *Lb. pentosus* et *Lb. paraplantarum*, et de *Lc. lactis*, à savoir, *Lc. lactis subsp. cremoris*, ont été définitivement exclues.

Les isolats de *L. mesenteroides* (groupe A7) avaient un génotype similaire à ceux de la sous-espèce *dextranicum* (profils Rep-PCR 1, 2), *mesenteroides* (profil Rep-PCR 3), ou autre (profil Rep-PCR 4) (figure 37). Aucun n'avait un génotype similaire à celui de la sous-espèce *cremoris*. Les isolats de la sous-espèce *inconnue* étaient nettement discriminés des isolats de la sous-espèce *mesenteroides* par leurs profils REP-PCR (profils Rep-PCR 3 versus 4 ; figure 37), et des isolats de la sous-espèce *dextranicum* par leurs profils REP-PCR (profils Rep-PCR 1,2 versus 4 ; figure 37).

Le groupe *Lc. lactis* A9 était très semblable au groupe A de *L. lactis subsp. lactis*, obtenu à partir de l'analyse dite « Multilocus sequence Analysis » et de profils génotypiques GTG<sub>5</sub> (Rademaker *et al.*, 2007).

Enfin, aucun nom d'espèce ni de genre n'a pu être donné aux sept coques restants appartenant aux groupes : A2, A3, A4, A6 et A12 car leurs profils Rep-PCR ne se regroupaient avec aucun des profils de référence de la souchothèque à plus de 40 % d'homologie. Les profils Rep-PCR et les PCR spécifiques ont indiqué que ce n'étaient ni des entérocoques, ni des pédiocoques, ni *Streptococcus thermophilus* ou *gallolyticus*, ni *L. garviae*.

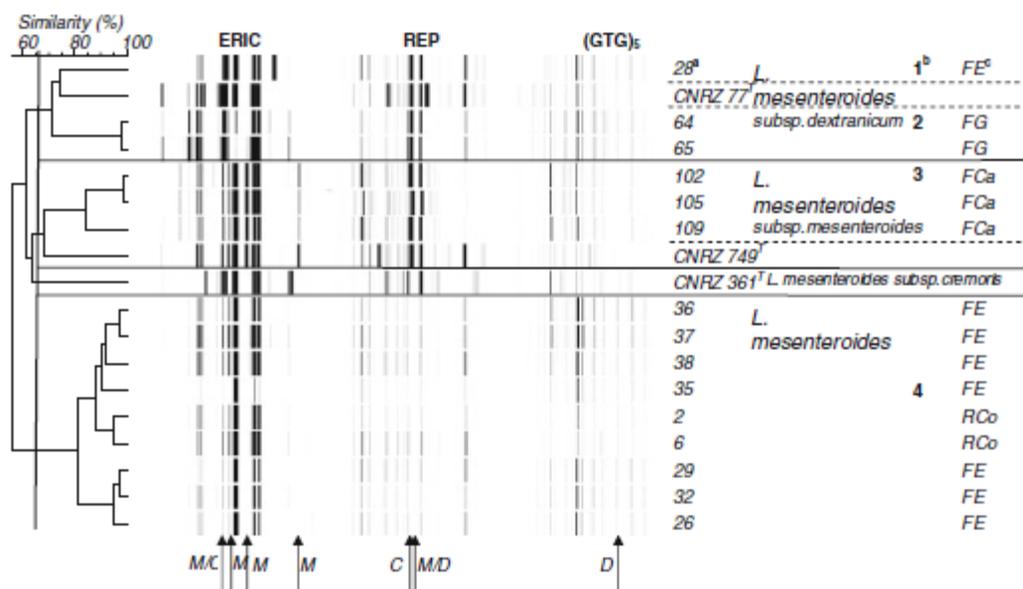


Dendrogram based on numerical analysis of the 84 concatenated Rep-PCR fingerprints combining ERIC, REP, and (GTG)<sub>5</sub> fingerprints. <sup>a</sup>Name of isolate or type strain. <sup>b</sup>Genotypic affiliation by Rep-PCR, *in bold* Rep-PCR affiliation confirmed by specific PCR. <sup>c</sup>No. of the Rep-PCR group. <sup>d</sup>Nonidentified

**Figure 37** : Dendrogramme des profils Rep-PCR des 84 isolats et d’une sélection de LAB de référence (Bendimerad et al., 2012). Lire 106bis au lieu de 106 pour le groupe *Lb. plantarum*

- **Diversité génotypique au sein des espèces et sous espèces**

Vingt et un profils Rep-PCR ont pu être distingués parmi les 84 isolats (Figure 37). Un profil a été observé dans chacun des sept groupes A2-A4, A6, A8, A10 et A12 et A3, deux profils différents dans chacun des trois groupes A1, A5 et A11 (*E. durans*, *Lb. plantarum*, et *E. hirae*), et 4 profils différents dans les groupes A9 (*Lc. lactis lactis*) et A7 (*Leuc. mesenteroides*), avec un pour la sous-espèce *mesenteroides*, un pour la sous-espèce *inconnue* et deux pour la sous-espèce *dextranicum*.



Dendrogram and Rep fingerprints of *Leuconostoc*. Rep-group=group A7. Clustering was made with concatenated Rep-fingerprints combining ERIC, REP, and (GTG)<sub>5</sub> fingerprints. Solid horizontal lines separate *Leuconostoc* subspecies. Dotted horizontal lines separate dissimilar fingerprints within *Leuconostoc* subspecies. <sup>a</sup>Name of isolate or type strain. <sup>b</sup>Genotypic affiliation by Rep-PCR. <sup>c</sup>See Table 2 for the meaning of RCo, RG, RS, FCa, FE, FG, and FM. Arrows indicate specific bands of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (C), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (D), and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (M) fingerprints

**Figure 38** : Dendrogramme et profils Rep-PCR du groupe Rep A7 correspondant aux isolats et aux souches de référence *L. mesenteroides* (Bendimerad et al., 2012). a, nom des isolats et des souches de référence ; b, nom des isolats et des souches de référence ; c, voir tableau 20 pour la signification

**Tableau 20** : Fréquence et identité des coques mésophiles isolés des différents laits crus et fermentés

Produits laitiers			Isolats						Numéro du profil (nombre isolats)
Nature (°)	Lieu géographique	Nombre d'échantillons /fermes	Nombre	Milieu d'isolement	groupe -Rep	Genre <sup>c</sup>	espèce subsp biovar		
Cru de vache (RCo)	Ouest Algérien <i>Tlemcen ville</i>	15/6	4	MRS - vancomycin	A7	<i>L.</i>	<i>mesenteroides</i>	4 (2)	
					A2, A6	?	?	(1), (1)	
			11	M17	A9	<i>L.</i>	<i>lactis lactis diacetylactis</i>	4 (1)	
					A1	<i>E.</i>	<i>durans</i>	1 (9)	
		A4	?	?	(1)				
Cru de chèvre (RG)	Ouest Algerien <i>Tlemcen ville</i>	14/8	7	M17	A11	<i>E.</i>	<i>hirae</i>	1 (2), 2 (2) (3)	
					A8	<i>E.</i>	<i>faecalis</i>		
Fermenté de chèvre (FG)	Ouest Algerien <i>Tlemcen ville</i>	3/2	2	MRS- vancomycin	A7	<i>L.</i>	<i>mesenteroides dextranicum</i>	2 (2)	
Fermenté de jument (FM)	Ouest Algerien <i>Tlemcen( ville)</i>	6/3	10	M17	A9	<i>L.</i>	<i>lactis lactis diacetylactis</i>	1 (6), 2 (3), 3(1)	

**Tableau 20 (suite et fin)**

Produits laitiers			Isolat					
Nature ( <sup>a</sup> )	Lieu géographique	Nombre d'échantillons /fermes	Nombre	Milieu d'isolement	groupe - Rep	Genre <sup>c</sup>	espèce subsp biovar	Numéro du profil (nombre isolats) number
Fermenté de chamelle (FCa)	Sahara Algérien <i>Bechar</i> <i>et</i> <i>Tamanrasset</i>	5/3	16	MRS - vancomycin	A7	<i>L.</i>	<i>mesenteroides mesenteroides</i>	3 (3)
					A11	<i>E.</i>	<i>hirae</i>	1 (10)
					A5	<i>L.</i>	<b><i>plantarum</i></b>	1 (2), 2 (1)
			5	M17	A11	<i>E.</i>	<i>hirae</i>	1 (2)
					A8	<b><i>Ent.</i></b>	<i>faecalis</i>	(3)
<b>Total</b>		79/40	84	2	12	4	6 espèces établies 3 sous-espèces établies	21 (84)

<sup>a</sup> forme abrégée

<sup>b</sup> voir figure 38

<sup>c</sup> en gras, détermination par PCR spécifique

### I-3-Caractérisation des isolats

#### I-3-1 Phénotypes des isolats de *Leuconostoc mesenteroides*

##### ***Phénotypes utilisés pour l'identification***

Tous les isolats de *Leuconostoc* ont poussé en présence de 2,5 % de NaCl et ont utilisé le lactose et le galactose. Ils ont aussi produit de l'acétoïne à l'exception de quatre isolats de *L. mesenteroides* de la sous-espèce *inconnue* (*L. mesenteroides* de génotype 4), les isolats 26, 29, 37 et 38. Ils ont tous produit du dextrane, en particulier les *L. mesenteroides* ayant le profil génotypique *mesenteroides/cremoris* alors que la souche type de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* n'en produit pas (Garvie, 1986; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004; ce travail). Ils n'ont pas utilisé le citrate, ou très faiblement pour la souche type de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*.

##### ***Capacité acidifiante***

###### *Capacité coagulante rapide*

Quatre isolats sur 14 de *Leuconostoc* testés ont été capables de coaguler le lait après une incubation à 30 °C pendant 18 h (tableau 21). L'isolat de la sous-espèce *mesenteroides* a coagulé le lait malgré une faible quantité d'acide.

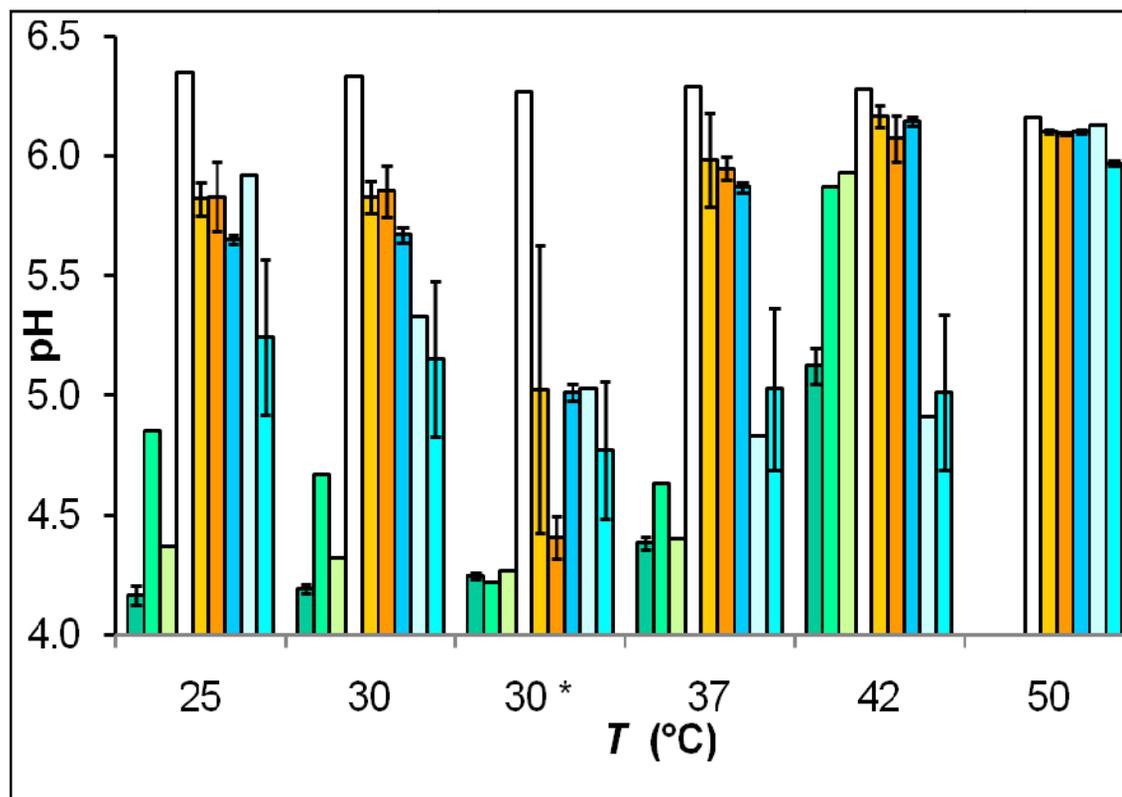
**Tableau 21:** Acide produit par les isolats *Leuconostoc* à coagulation rapide après 18h de culture en lait à 30°C

Isolats	Acidité (°D)
<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> 109	79°C
<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>inconnue</i> 06	31.5
26	28.7
32	31.8

##### *Effet de la température sur la capacité acidifiante* (figure 39)

Pour tous les isolats et les souches type, sauf celle de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, les températures de 25 °C et 30 °C ont permis d'obtenir les pH les plus bas. Les températures de 42 °C et 50 °C ont seulement permis une légère diminution du pH. Contrairement aux autres isolats, y compris les isolats appartenant à la sous-espèce *inconnue*, la souche type de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* a également de mieux en

mieux acidifié le lait lorsque la température est passée de 25 °C à 37 °C – 42 °C, ce qui n'a pas encore été décrit pour les leuconostocs.



**Figure 39** : Valeurs moyenne du pH de laits stériles (lait 'Sabourin') ensemencés par les isolats indiqués plus bas, après 48 h d'incubation, en fonction de la température d'incubation.

\*,: addition d'extrait de levure à 1 %

(■), *L. lactis* subsp. *lactis* ayant les empreintes Rep *L. lactis* 1 et 2 (9 isolats); (■), *L. lactis* subsp. *lactis* ayant l'empreinte Rep *L. lactis* 3 (1 isolat); (■), *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ142<sup>T</sup>; (■ ■), inoculated milk; (■), *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (3 isolats and CNRZ 77<sup>T</sup>); (■), *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (3 isolats et CNRZ 749<sup>T</sup>); (■), dextran-positive *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* (6 isolats); (■), dextran-negative *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (CNRZ 361<sup>T</sup>); (■); *E. hirae* and *E. durans* (2 isolats représentant *E. hirae* et 1 isolat représentant *E. durans*).

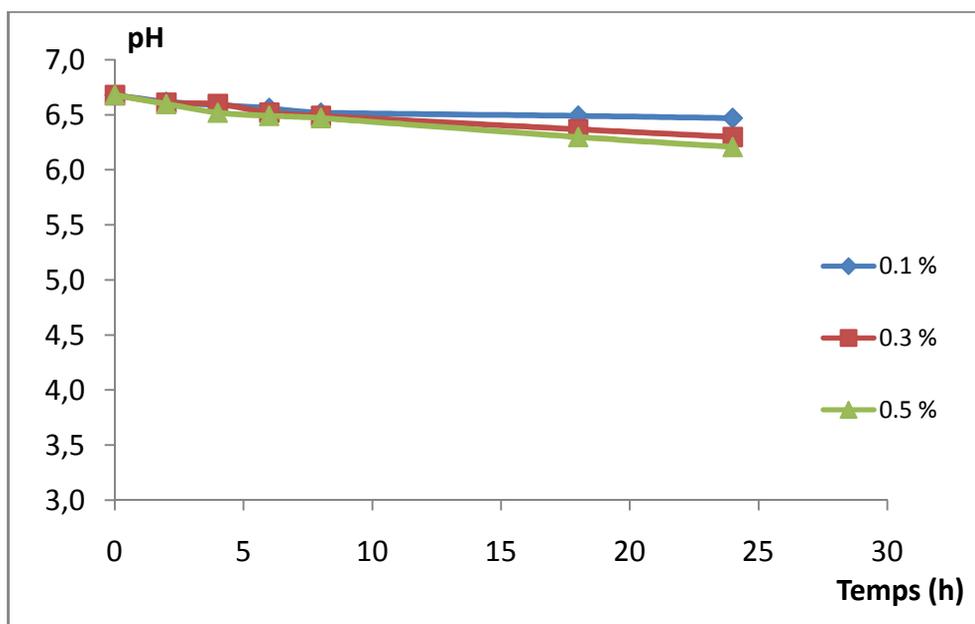
#### Effet de l'extrait de levure sur la capacité acidifiante à 30 °C

Il faut d'abord noter que, dans les mêmes conditions (température, teneur en extrait de levure, temps de culture), les valeurs de pH atteintes par les cultures de leuconostocs étaient beaucoup plus élevées en lait 'Régilait' qu'en lait 'Sabourin', surtout pour les sous-espèces *dextranicum* et *inconnue*. En lait 'Régilait', les valeurs de pH étaient supérieures à 6,0 pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *inconnue* et à 4,75 pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* à 24 heures (figures 40 - 42); en lait

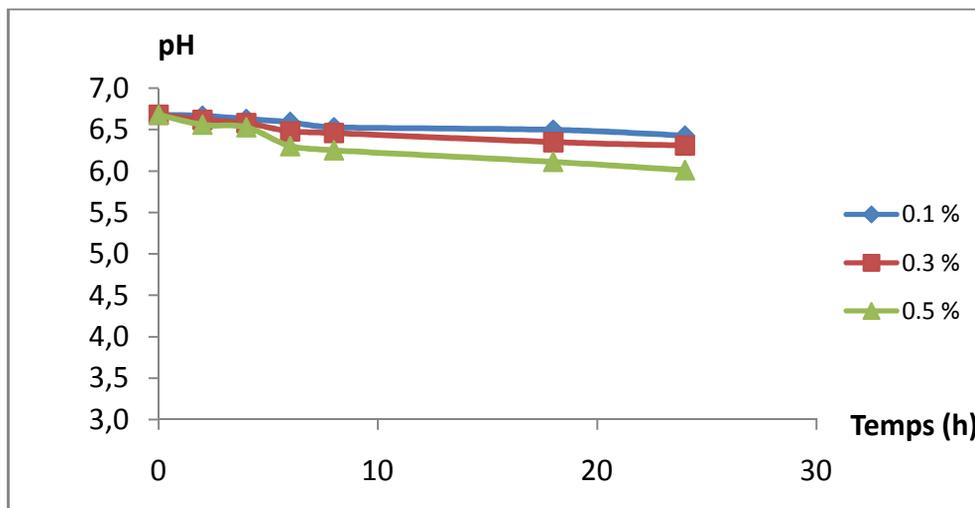
'Sabourin', les valeurs moyennes de pH étaient déjà de 5,32 pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, 4,47 pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et 5,42 pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* à 24 heures de culture (non montré). Le lait 'Sabourin' est certainement plus riche que le lait 'Régilait' en facteur(s) de croissance nécessaire(s) à l'activité des leuconostocs, surtout celles des sous-espèces *dextranicum* et *inconnue*. Ce(s) facteur(s) limitant(s) n'a (ont) pas été apporté(s) au lait 'Régilait' par les 0,1 % d'extrait de levure ajouté.

A 30 °C, la présence d'extrait de levure à 0,1 % dans le lait 'Sabourin' a entraîné un pH plus bas en fin d'acidification (après 48 h d'incubation) pour tous les leuconostocs; mais la hiérarchie entre les capacités acidifiantes de chaque sous-espèce observée en absence d'extrait de levures n'a pas été modifiée (figure 39). Ce sont les isolats et la souche type *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* qui ont le mieux répondu à la présence de l'extrait de levures, ce qui est conforme aux exigences plus faibles de cette sous-espèce pour sa croissance (Garvie, 1986). A l'opposé, c'est la souche type de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* qui a le moins bien répondu. Ce sont les isolats de la sous-espèce *mesenteroides* qui acidifiaient aussi le plus rapidement le lait 'Régilait' en présence de 0,1 % d'extrait de levure (figures 40-42).

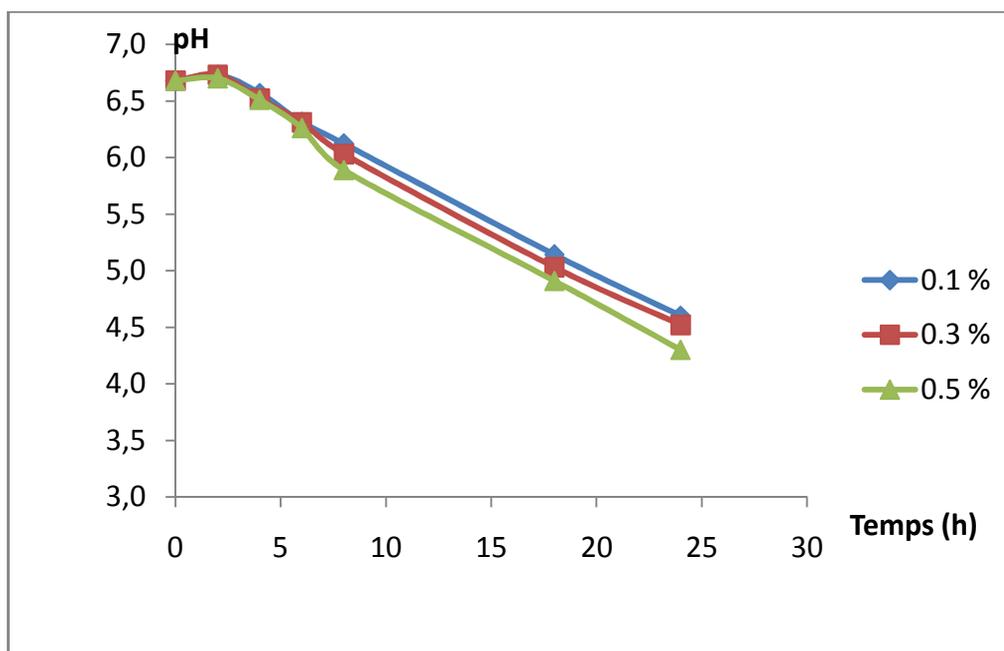
L'ajout d'extrait de levures à 0,3 et 0,5 % au lieu de 0,1 % a provoqué une augmentation de la vitesse d'acidification du lait 'Régilait', plus importante pour 0,5 %, à des stades différents selon la sous-espèce : entre 4 et 6 heures pour la sous-espèce *dextranicum*, entre 6 et 8 heures pour la sous-espèce *mesenteroides*, et entre 8 et 24 heures pour la sous-espèce *inconnue* (figures 40-42). Les différences de pH se sont maintenues jusqu'à 24 heures de culture.



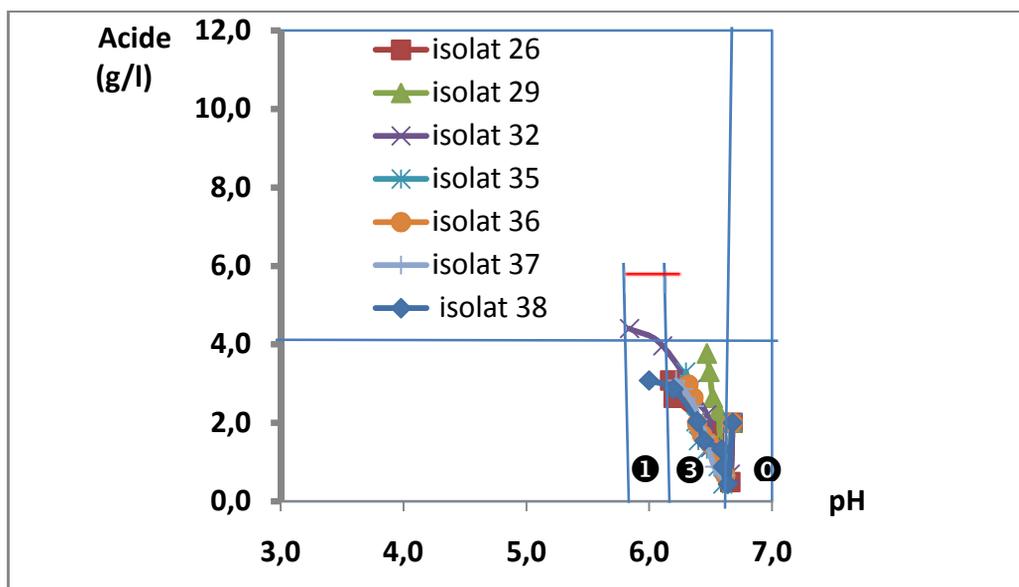
**Figure 40** : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* '29' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats de la même sous espèce se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* ont été représentés pour cette sous-espèce.



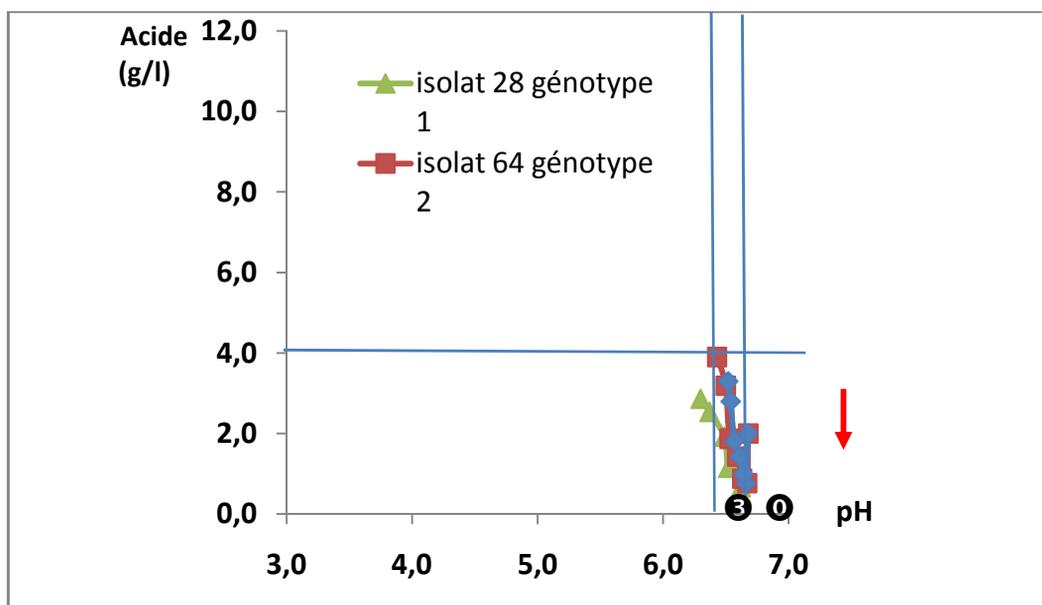
**Figure 41**: Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* '64' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats de la même sous espèce se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ont été représentés pour cette-espèce.



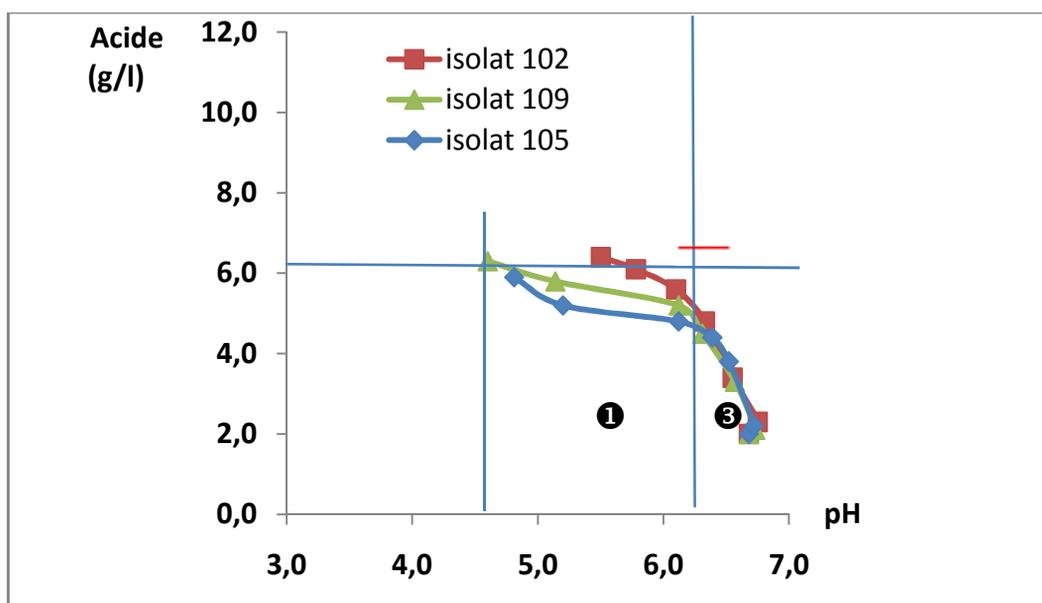
**Figure 42 :** Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* '109' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats de la même sous espèce se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ont été représentés pour cette sous-espèce.



**Figure 43:** Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *inconnue* (un seul génotype Rep ); Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. Les isolats 02 et 06 ne figurent pas par manque de données). ①, ② et ③, numéro des phases. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.



**Figure 44** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum*. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ❶ et ❷, numéro des phases. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.



**Figure 45** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* (un seul génotype Rep). Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ❶ et ❷, numéro des phases. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.

### Evolution du pH en fonction de l'acide produit

Les graphes des figures 43, 44 et 45 montrent l'évolution du pH en fonction de l'acide produit dans le lait supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pendant 24 heures pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *L. mesenteroides* subsp. *inconnue*.

Sur une durée de 24 h à 30 °C, les valeurs de pH n'étaient pas liées de façon linéaire aux quantités d'acides présentes dans le lait. On peut distinguer plusieurs phases, selon la pente de la courbe. Ces phases ont été numérotées de la même façon pour les graphes leuconostocs, entérocoques, lactobacilles et lactocoques.

On observe les phases type 0, 1 et 3 pour les leuconostocs. Les courbes des isolats *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* sont proches entre elles bien que distinctes entre les deux sous-espèces. Les courbes des isolats ayant le même génotype Rep ne sont pas forcément superposables (figures 43, 44 et 45). Les courbes des isolats d'une même sous-espèce, en l'occurrence *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, diffèrent selon le génotype Rep de l'isolat (figure 44).

On retrouve à 24 heures la hiérarchie déjà observée à 48 heures dans les mêmes conditions (température, milieu ; figure 39) entre les valeurs du pH atteintes pour les isolats des trois sous-espèces, *mesenteroides*, *dextranicum* et *inconnue*, avec des valeurs plus basses pour les isolats de la sous-espèce *mesenteroides*.

La phase type 0 est visible pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* et *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* mais pas pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* aux alentours de pH 6,7. Elle a duré environ 2 heures.

Chez les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* cette phase type 0 n'aurait pas existé, ou n'aurait pas été visible du fait d'un métabolisme plus rapide. La première phase visible pour ces isolats était la phase type 3, au cours de laquelle le pH a diminué de 6,8 à 6,2 alors que la quantité d'acide qui s'accumulait a augmenté de 2 à 5 g/l. Cette phase type 3 a suivi la phase type 0 et a été la dernière phase observée chez la majorité des isolats *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* et tous les isolats *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* pendant les 22 dernières heures de culture. Cette phase type 3 n'a duré qu'environ 4 heures pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Pour les isolats *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, et deux des isolats *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* on voit après la phase type 3 et des valeurs de pH aux environs de 6,2, une phase type 1 au cours de laquelle le pH a beaucoup diminué, passant de 6,2 à au plus 4,7, alors que moins d'acide que dans la phase 3 précédente s'était accumulé dans le lait (2,64, 4.40, 6.40, 5.90 et 6.30g/l).

Quelle que soit la sous-espèce considérée, l'ajout d'extrait de levure à 0,3 et 0,5 % au lieu de 0,1 % est associé à des valeurs de pH plus basses au cours de la phase type 3.

### I-3-2. Phénotypes des isolats *Lactococcus lactis*

#### ***Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique***

Tous les isolats *L. lactis* se sont développés en présence de 2,5 % de NaCl mais pas 6,5 %. Tous possèdent une protéase et ont utilisé le maltose, le galactose, le lactose et l'arginine ce qui est un phénotype majoritaire chez la sous-espèce *lactis* de *L. lactis*.

Ils ont aussi utilisé le citrate et produit de l'acétoïne ce qui est typique du biovar *diacetylactis* de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. De 50 % à 75 % des colonies des isolats 92, 93 et 94 ont utilisé le citrate sur milieu KMK.

#### ***Capacité acidifiante***

##### *Capacité coagulante rapide*

A l'exception des isolats 93 et 94 avec génotype 2 qui sont à coagulation lente, tous les autres isolats de *L. lactis* analysés ont coagulé le lait après une incubation de 18 h à 30 °C. Les concentrations d'acides mesurées sont indiquées dans le tableau 22.

**Tableau 22** : Acide produit par les isolats de lactocoques à coagulation rapide après 18 heures de culture en lait 'Régilait' à 30 °C (en °D).

<b>Isolats</b>	<b>Acidité (°D)</b>
<i>lactis génotype 1</i>	
89	100,1
90	96,8
91	97,9
95	92,4
96	95,7
97	99,0
<i>lactis génotype 2</i>	
92	97,9
<i>lactis génotype 3</i>	
98	76,8
<i>lactis génotype 4</i>	
15	75,9

Les lactocoques génotypes 1 et 2 ont produit en moyenne 3 fois plus d'acide que les leuconostocs pendant la même durée de culture en lait.

La quantité d'acide mesurée est similaire pour tous les isolats sauf pour les isolats 15 et 98 (génotypes 4 et 3, respectivement) pour lesquels elle était plus faible. L'isolat 15 n'était probablement pas pur. Lors des essais de capacité acidifiante les cultures de cet isolat contenait vraisemblablement une majorité d' *E. hirae* de génotype 2, au vu de son profil de réponse pH en fonction de l'acide produit se rapprochant de celui d'un isolat *E. hirae* de génotype 2 par sa forme (figure 45), mais produisant beaucoup plus d'acide (8 g/l), et des incohérences que nous avons rencontrées plus tard en réalisant l'identification moléculaire, selon la colonie isolée à partir de laquelle était faite l'identification. Nous en sommes restés à la dernière identification moléculaire, *L. lactis*, correspondant à un isolat pur. Par contre l'isolat 98 a eu une réponse cohérente au cours des essais d'acidification menés en Algérie (tableau 22 et cinétiques pH en fonction du temps non montrée) et en France (figure 39), et par rapport à son identification moléculaire.

#### Effet de l'extrait de levure sur l'acidification

L'ajout d'extrait de levure au lait à des concentrations allant de 0,1 % à 0,5 % a augmenté les vitesses d'acidification des lactocoques de génotypes 1, 2 et 3, et, à une concentration de 0,1 % a fait baisser la valeur du pH minimum atteint par les cultures de lactocoques de génotype 3. Le lactocoque de génotype 4 (isolat 15) n'a pas été étudié (cf. problème pureté décrit au-dessus).

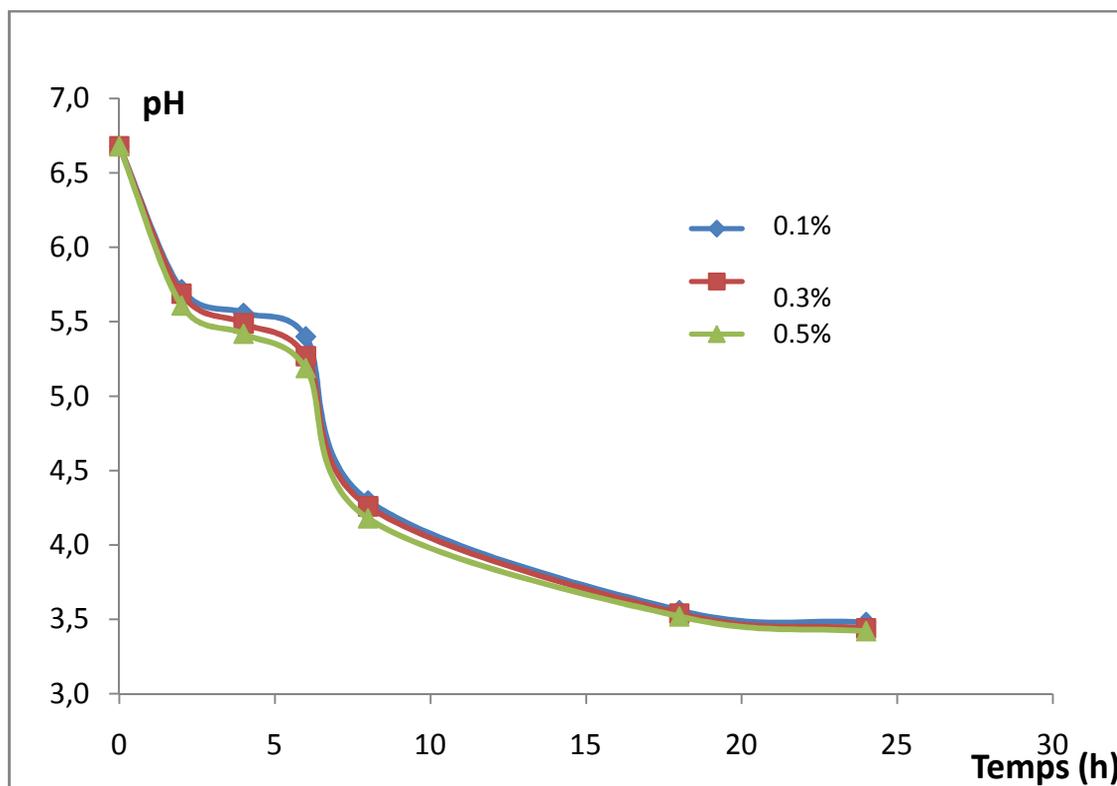
Il faut d'abord noter que, de façon générale, les valeurs de pH atteintes par les cultures de lactocoques étaient beaucoup plus basses en lait 'Régilait', avec des valeurs aux environs de 3,5 (figures 46 et 47), qu'en lait 'Sabourin', avec des valeurs aux environs de 4,15 (figure 39). Le lait 'Sabourin' est certainement moins riche que le lait 'Régilait' en facteur(s) de croissance nécessaire(s) à l'activité des lactocoques. Ce(s) facteur(s) limitant(s) n'a (ont) pas été apporté(s) par les 0,1 % d'extrait de levure.

C'est surtout pour l'isolat *L. lactis* de génotype 3 que l'ajout d'extrait de levure au lait a induit une acidification significativement meilleure du lait 'Sabourin' à 48 heures de culture (figure 39). Pour les isolats *L. lactis* de génotypes 1 et 2, la différence d'acidification entre ajout ou non d'extrait de levure n'est pas significative. L'isolat 98 était donc plus exigeant que les autres pour sa croissance, puisqu'il a fallu compléter le lait par de l'extrait de levures pour qu'il puisse acidifier de la même manière que les autres après 48 heures à 30 °C. La quantité d'acide mesurée après 24 h de culture en lait 'Régilait' plus 0,1 % d'extrait de levures (figure 47; seuls les isolats de génotype *L. lactis* de génotypes 1 et 2 y figurent) est similaire à celle produite après 18 h de culture en lait sans extrait de levure (tableau 22). L'ajout d'extrait de levure à 0,3 % au lieu de 0,1 % a modifié la vitesse d'acidification entre 4

et 6 heures de culture, ou 6 et 8 heures, selon les souches (figure 46). L'ajout d'extrait de levure à 0,5 % au lieu de 0,1 % a augmenté la vitesse d'acidification plus tôt, entre 2 et 4 heures de culture, ou 4 et 6 heures, selon les souches (figure 46). Selon les souches, les différences de pH étaient moins élevées ou absentes à 24 heures de culture.

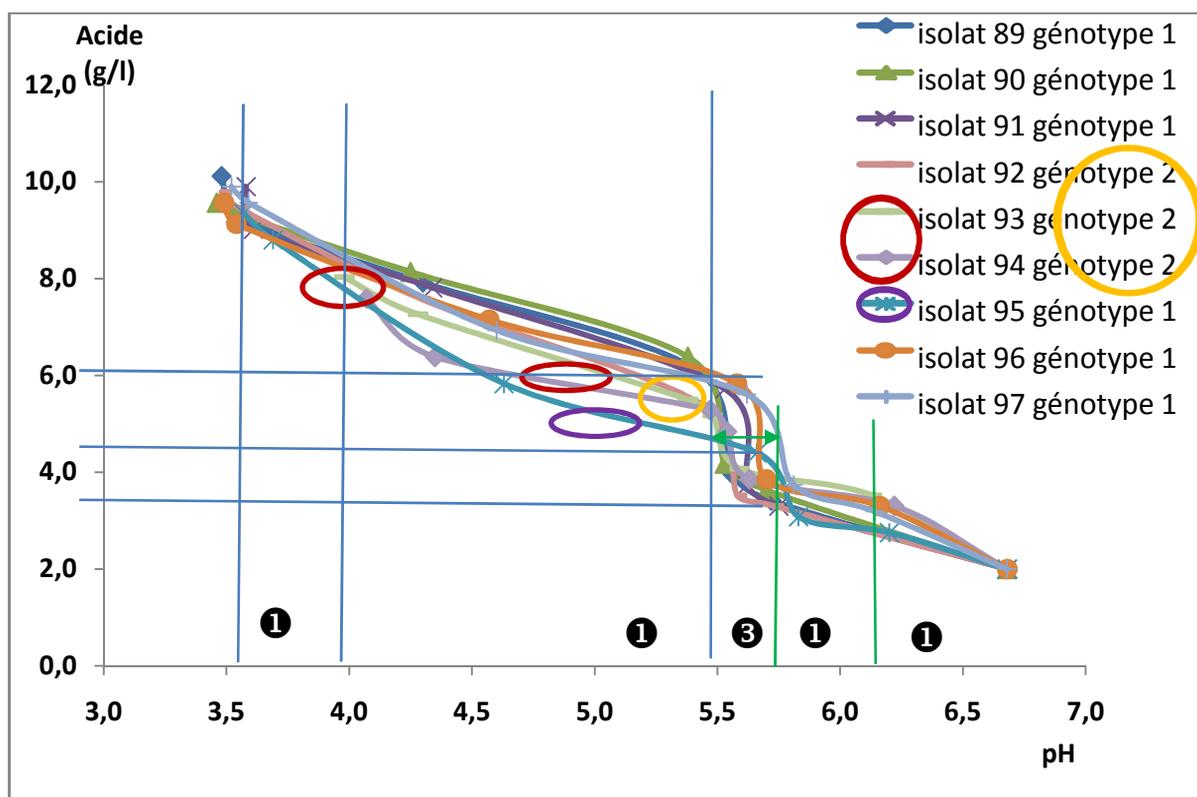
Effet de la température sur l'acidification (figure 39)

Les valeurs de pH indiquées sur la figure 39 après 48 h d'incubation étaient déjà les mêmes après 24 heures, à l'exception des valeurs de l'isolat 98 qui diminuaient encore entre 24 et 72 heures d'incubation. Ainsi, à l'exception de l'isolat 98 de génotype *L. lactis* 3, les isolats *L. lactis* subsp. *lactis* de génotypes 1 et 2 ont rapidement et beaucoup acidifiés aux températures de 25 °C, 30 °C et 37 °C, et encore à 42 °C. L'acidification à cette dernière température au-delà de pH 5,5 est atypique pour des *L. lactis* subsp. *lactis*. Les différences d'acidification entre l'isolat 98 et les autres isolats ont été retrouvées en incubant 2 laits reconstitués d'origine différente ('Sabourin' figure 39; et 'Régilait' tableau 32) à 30 °C.



**Figure 46:** Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *L. lactis* subsp. *lactis* '96' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats de la sous espèce *L. lactis* subsp. *lactis* se ressemblent, les graphes d'un seul isolat ont été représentés.

Evolution du pH en fonction de l'acide produit



**Figure 47** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait') supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *L. lactis* subsp. *lactis*. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. Les isolats 15 et 98 (génotypes 3 et 4) ne figurent pas (voir § capacité coagulante rapide pour l'isolat 15; les données 'acidité' manquent pour l'isolat 98). Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ❶, ❷ et ❸, numéro des phases.

La production de lactate après 24 heures de culture (figure 47) est similaire à celle obtenue après 18 heures de culture (tableau 22). La figure 47 montre même que l'accumulation de lactate est pratiquement terminée après huit heures de culture en lait reconstitué 'Régilait'.

Sept des neuf isolats testés ont produit 10 g d'acide lactique par litre de lait après 24 heures d'incubation. Deux des trois isolats de génotype 2, les isolats 93 et 94, ont à la fois produit moins de lactate (20% de moins) et moins acidifiés (valeurs de pH à 24 h de 4,0 au lieu de 3,5). On ne retrouve pas ces différences lors des essais montrés sur la figure 39, mais, comme indiqué au-dessus, le pH atteint a été systématiquement plus élevé dans le lait reconstitué 'Sabourin' (4,25 versus 3,50 dans des conditions similaires).

Sur une durée de 24 h à 30 °C, les valeurs de pH n'étaient pas liées de façon linéaire aux quantités d'acides présentes dans le lait. On peut distinguer plusieurs phases, selon la

pente de la courbe. Ces phases ont été numérotées de la même façon pour les graphes leuconostocs, entérocoques, lactobacilles et lactocoques. On observe les phases type 1 et 3 pour les isolats *L. lactis* subsp. *lactis* de génotypes 1 et 2. La première et la troisième phase sont des phases de type 1. La première phase correspond aux quatre premières heures de culture. Pendant cette phase, les valeurs de pH ont diminué de 6,7 à 5,7 tandis que la quantité d'acide a augmenté de 2,0 à 3,5 grammes d'acide lactique par litre de lait. La troisième phase correspond aux 18 dernières heures de culture. Pendant cette phase, les valeurs de pH ont diminué de 5,5 à au plus 3,5 tandis que la quantité d'acide a augmenté de 4,5 - 6,0 grammes d'acide lactique par litre de lait.

Une phase type 3 suit la première phase type 1 pendant environ 2 heures. Pendant cette phase, les valeurs de pH ont diminué de 5,7 à 5,5 tandis que la quantité d'acide a augmenté de 3,5 à au plus 6,0 grammes d'acide lactique par litre de lait.

### **I-3-3 Phénotypes des isolats d'entérocoques**

#### ***Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique***

Les isolats *Enterococcus faecalis* sont les seuls à avoir bien poussé sur un milieu contenant jusqu'à 6,5 % de NaCl. Tous les isolats d'entérocoques ont utilisé le galactose ; seuls les isolats appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* ont utilisé l'arginine. Le citrate a été utilisé par les isolats *Enterococcus faecalis*, plus faiblement par les isolats *E. hirae*, *E. sp.* et *E. durans* (couleur verdâtre au lieu de bleue du milieu KMK). Par ailleurs, les isolats *E. durans* et *E. faecalis* ont poussé entre 10 °C et 40 °C (pas fait pour les autres).

#### ***Capacité acidifiante***

##### ***Capacité coagulante rapide***

La concentration d'acide mesurée montre que ce sont les isolats *E faecalis* qui en produisaient le plus (50-75 °D) et les isolats *E. sp.* qui en produisaient le moins (20-25°D) (tableau 23). Il existe une grande variabilité à l'intérieur des isolats *E. hirae* de génotype 1, en partie expliquée par le manque de pureté avérée de certains isolats..

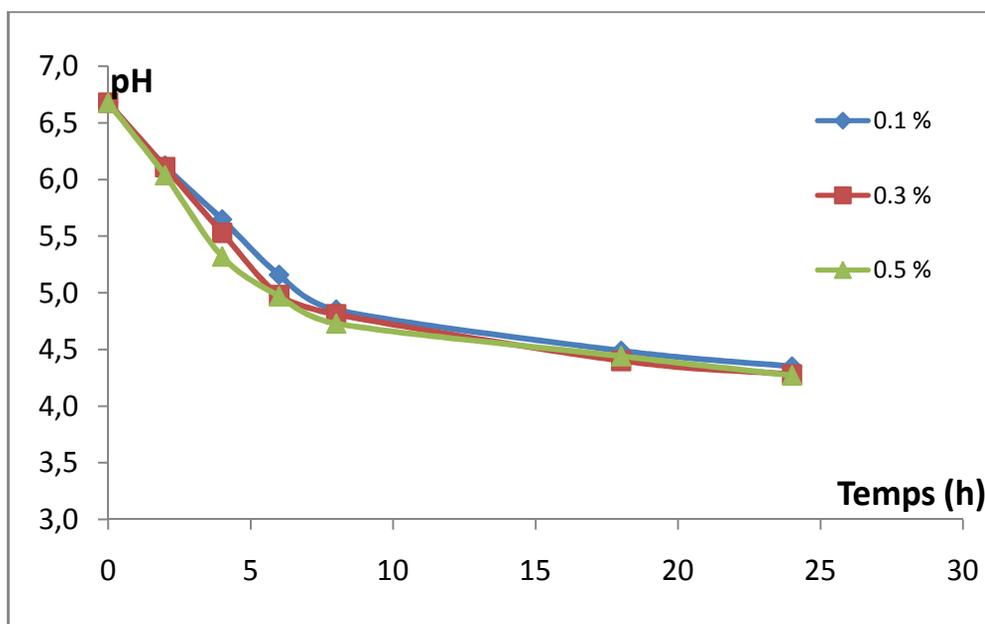
**Tableau 23** : Acide produit par les isolats d'entérocoques à coagulation rapide après 18 heures de culture en lait à 30 °C (en mM). Les isolats *E. durans* 53, *E. sp.* 27, 83,87 et *E. hirae* 30, 34, 43, 73, 99, 104, 106, 108, 111, et 113 étaient à coagulation lente. Les isolats surlignés en jaune avaient un problème de pureté avéré.

<b>Tableau 23 (1/2)</b>	
<b>Isolats</b>	<b>Acides (°D)</b>
<i>Enterococcus.durans</i>	
14	58,0
16	65,0
18	48,0
19	45,0
20	40,0
22	40,0
23	30,0
24	36,0
25	35,0
42	27.5
<i>Enterococcus hirae</i>	
génotype 1	
<b>33</b>	28,6
<b>69</b>	45,0
<b>71</b>	59,0
<b>73</b>	9,1
103	39,0
107	8,8
115	74,7
119	77,0
135	10,3
136	9,7
génotype 2	
39	44,0
<b>66</b>	68,0
49	49,5

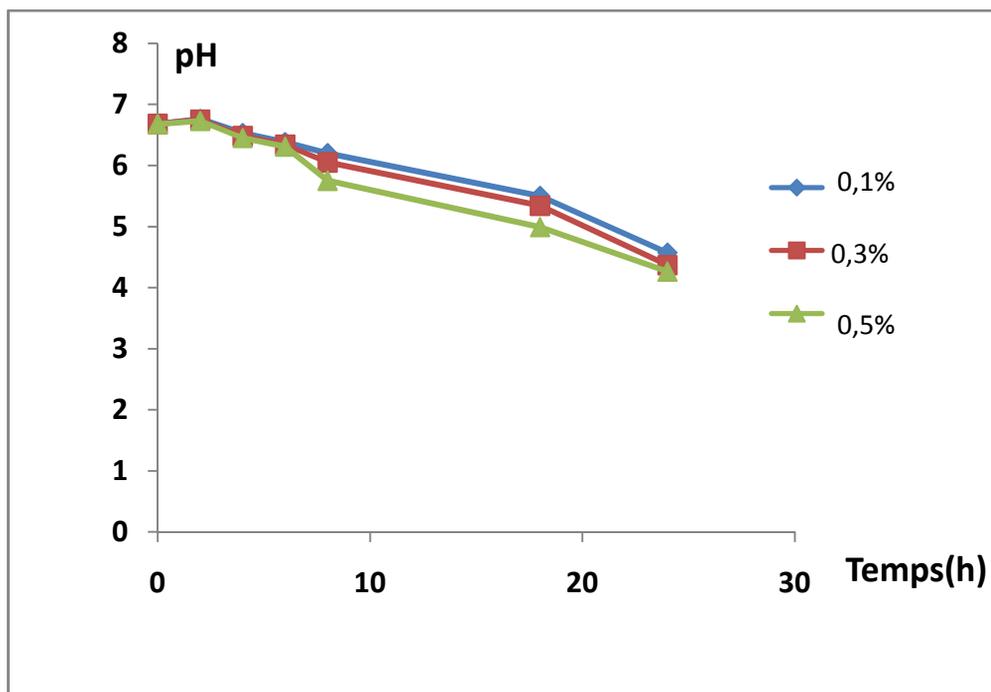
<i>Enterococcus faecalis</i>	
50	48,0
67	63,8
68	60,5
72	53,9
117	73,0
118	76,0
<i>Enterococcus sp</i>	
79	21,3
81	22,3
86	25,0
92	88,0

*Effet de l'extrait de levure sur la capacité acidifiante.*

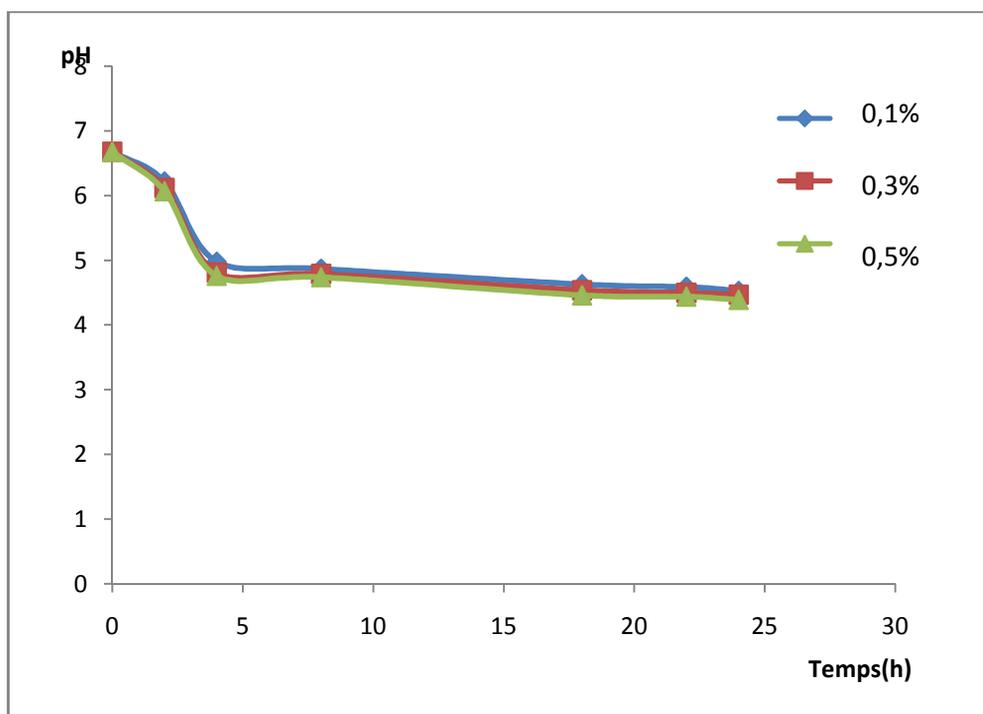
Un milieu enrichi d'extrait de levure à 0,1 % a permis aux isolats *E. durans* et *E. hirae* de mieux acidifier le lait 'Sabourin' après 48 heures de culture à 30 °C (figure 39, pas fait pour les isolats *E. faecalis* et *E. sp.*). Par ailleurs, la présence de 0,3 % et 0,5 % d'extrait de levure a permis d'accélérer la vitesse d'acidification entre 2 et 4 heures de culture d'isolats *E. durans* en lait 'Régilait'. Les différences de pH se sont maintenues jusqu'à 8 heures de culture (figure 48). La présence de 0,3 % et 0,5 % d'extrait de levure au lieu de 0,1 % a aussi permis d'accélérer la vitesse d'acidification entre 6 et 8 heures de culture d'isolats *E. hirae* en lait 'Régilait'. Les différences de pH se sont maintenues jusqu'à 24 heures de culture (figure 49). Par contre la présence de 0,3 % et 0,5 % d'extrait de levure au lieu de 0,1 % n'a permis d'accélérer la vitesse d'acidification des cultures d'isolats *E. hirae* de génotype 2, *E. faecalis* et *E. sp.* que de façon transitoire et limitée en lait 'Régilait' pendant les 24 heures de culture (figures 50-52), Cette augmentation de la vitesse d'acidification a eu lieu entre 2 et 4 heures pour les isolats *E. hirae* de génotype 2, entre 6 et 8 heures pour les isolats *E. faecalis* et entre 4 et 6 heures pour les isolats *E. sp.*.



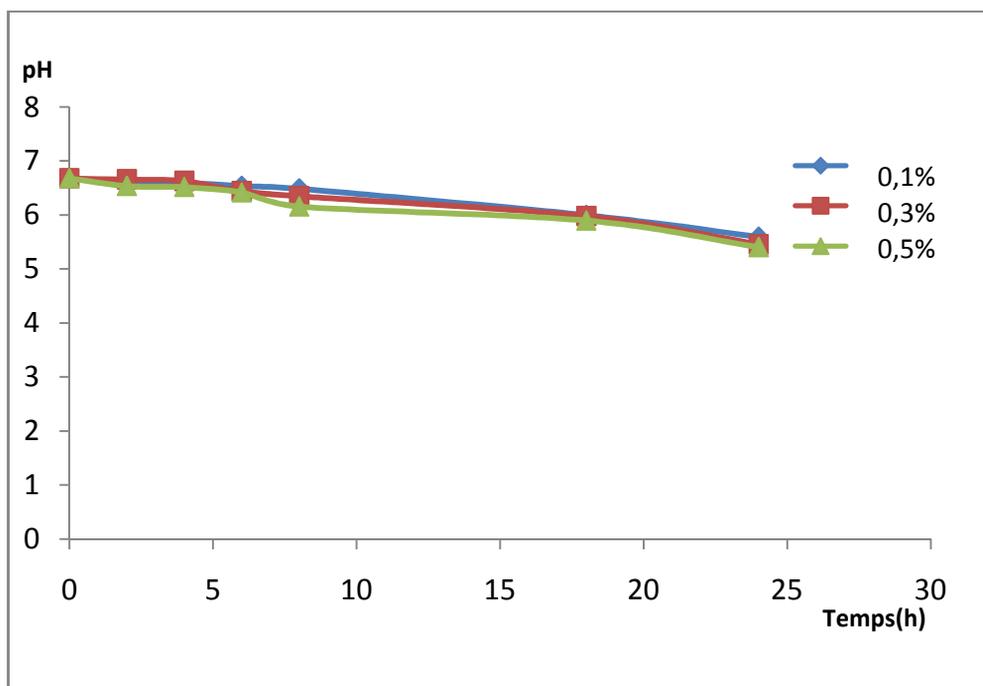
**Figure 48:** Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *E. durans* '22' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats *E. durans* se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *E. durans* ont été représentés.



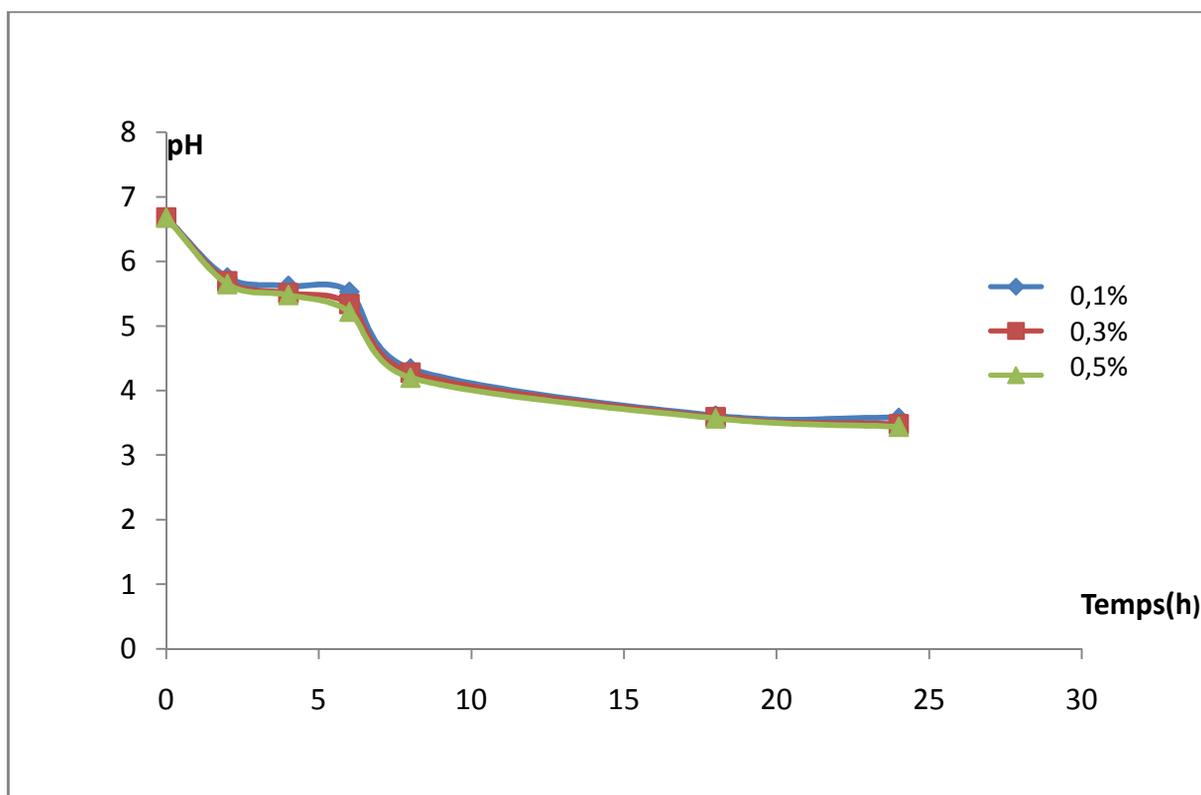
**Figure 49 :** Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *E. hirae* de génotype 1 '99' à 30 °C pendant 24h. Comme les graphes des isolats *E. hirae* de génotype 1 se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *E. hirae* de génotype 1 ont été représentés.



**Figure 50** : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat de l'isolat *E. hirae* de génotype 2 '39' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats *E. hirae* de génotype 2 se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *E. hirae* de génotype 2 ont été représentés.



**Figure 51**: Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat de l'isolat *E. sp.* '27' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats *E. sp.* se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *E. sp.* ont été représentés.



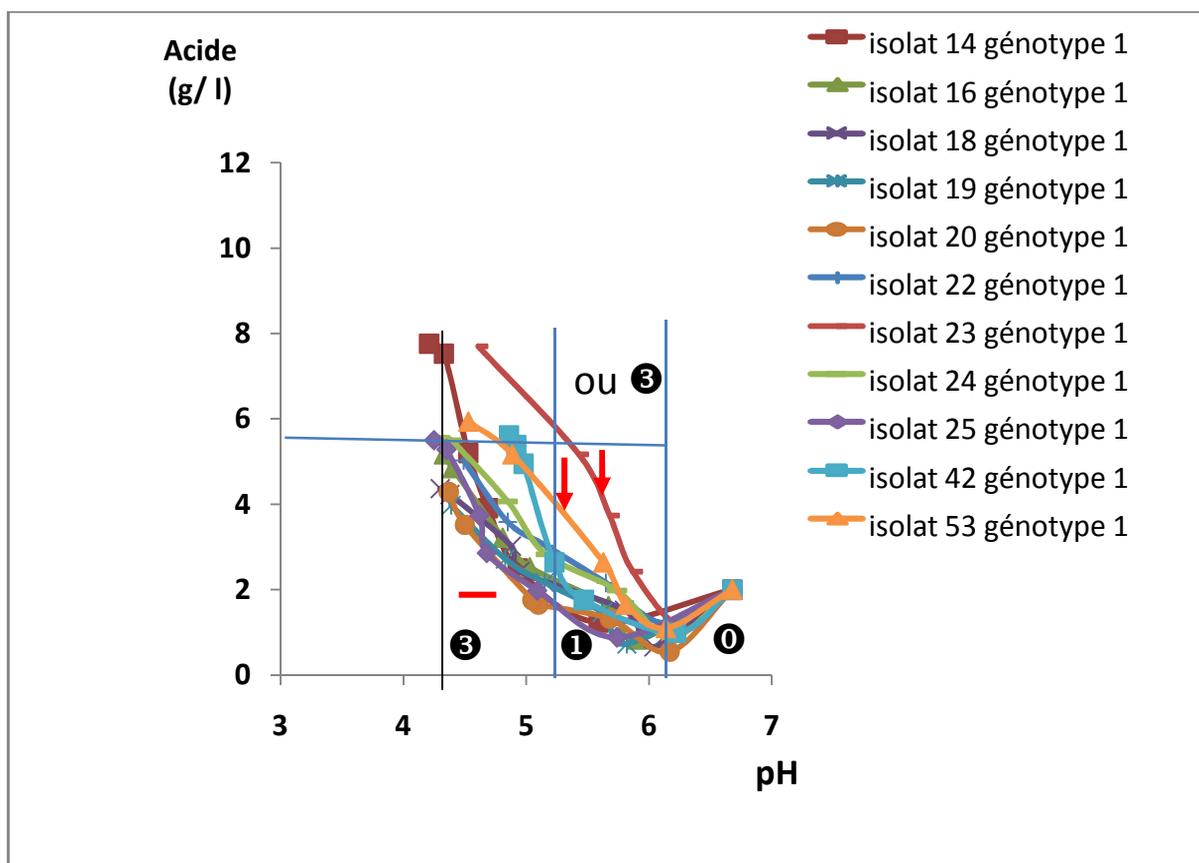
**Figure 52** : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *E. faecalis* '68' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des isolats *E. faecalis* se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *E. faecalis* ont été représentés.

#### Effet de la température sur la capacité acidifiante

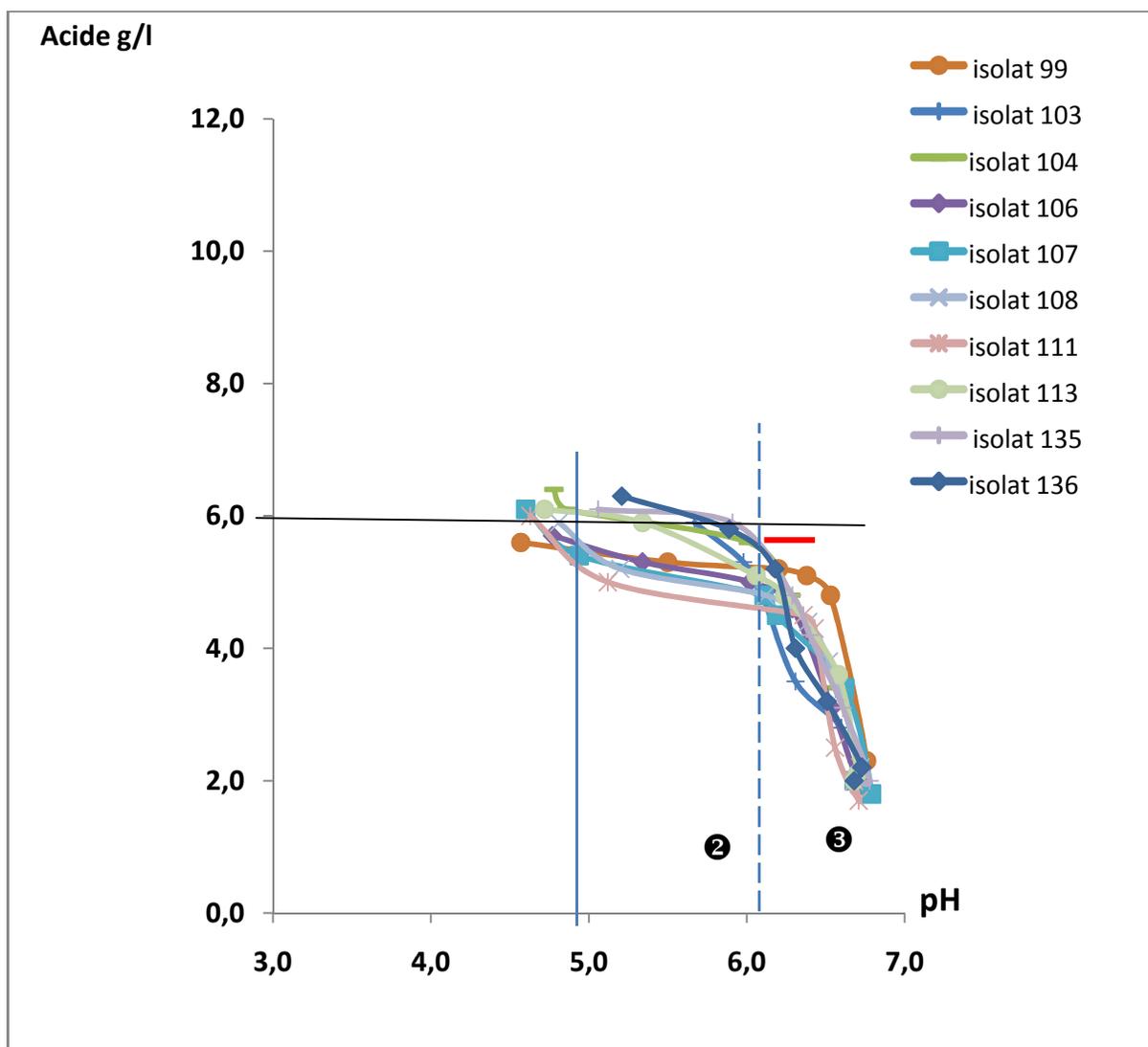
Les isolats *Enterococcus* pour lesquels l'effet de la température a été recherché, un isolat *E. durans* et deux isolats *E. hirae* de génotype 1, ont acidifié de façon similaire le lait après 48 heures de culture à des températures entre 25 °C et 42 °C (figure 39).

#### Evolution du pH en fonction de l'acide produit

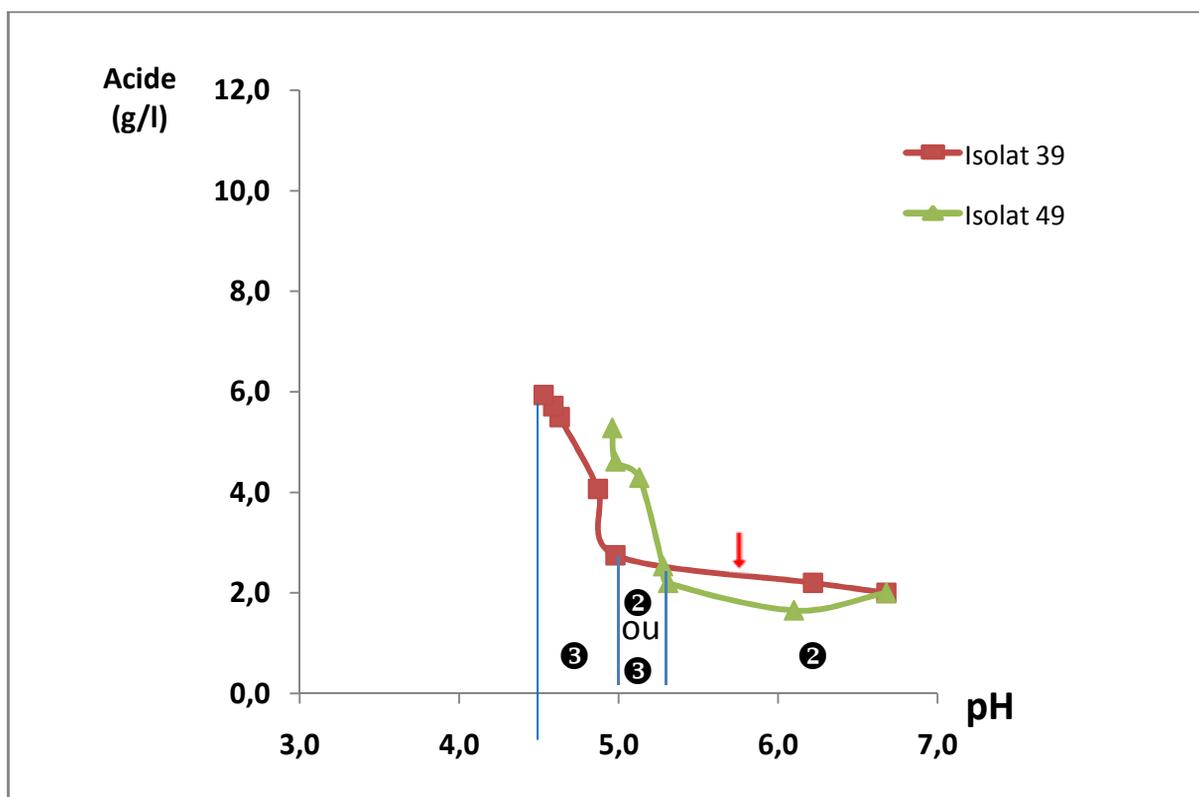
Les graphes des figures 53; 54, 55, 56 et 57 montrent l'évolution du pH en fonction de l'acide produit par les isolats *E. durans*, *E. hirae* de génotypes 1 et 2, *E. faecalis* et *E. sp.* pendant 24 heures à 30 °C dans le lait 'Régilait' supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures.



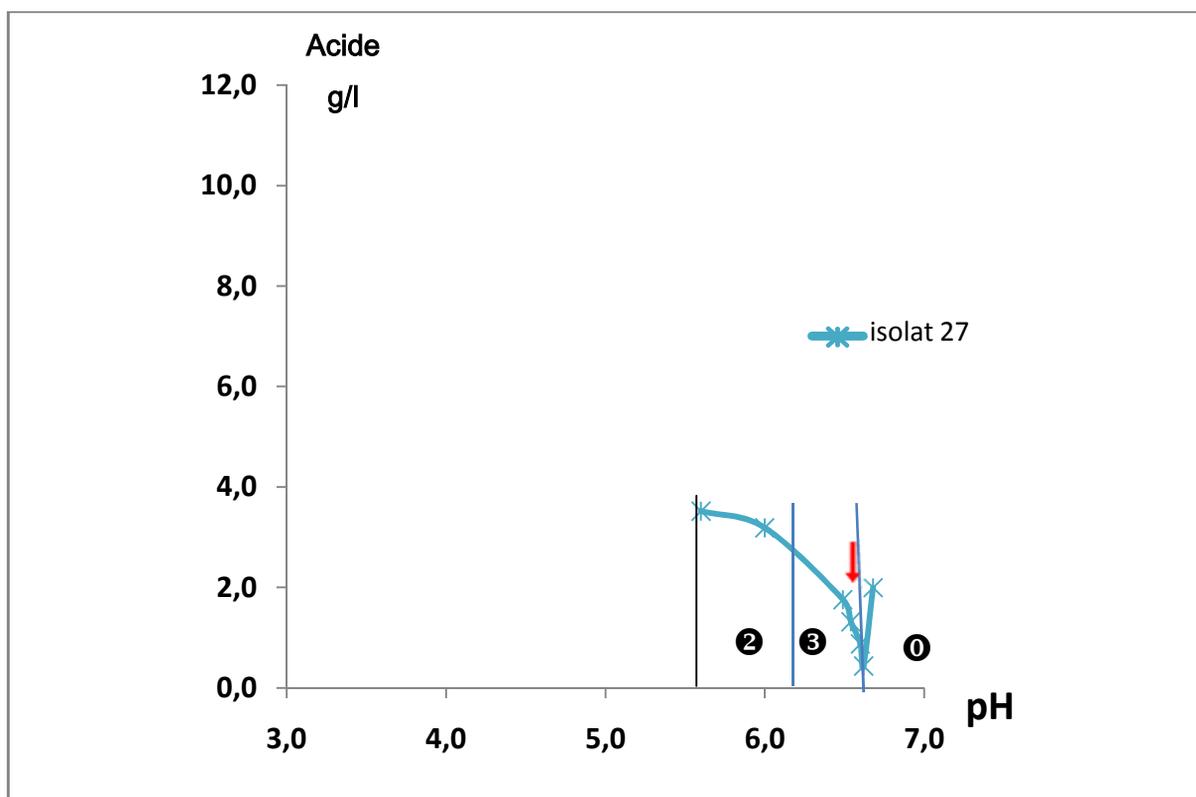
**Figure 53** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *E. durans* de génotype 1. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ①, ② et ③, numéro des phases. Il manque l'isolat 30 de génotype 2. Cet isolat n'était pas pur. Il a montré une réponse typique *L. mesenteroides* subsp. *inconnue* pour sa variation de pH en fonction de l'acide accumulé. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.



**Figure 54** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *E. hirae* de génotype 1. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ② et ③, numéro des phases. Il manque les isolats 33, 34, 43, 69, 71, 73, 115 et 119. Les données manquent pour les isolats 43, 115 et 119. Les isolats 33, 34, 69, 71 et 73 n'étaient pas purs. Les isolats 33 et 34 ont montré une réponse typique *L. mesenteroides* subsp. *inconnue*, et les isolats 69, 71 et 73 une réponse bâtarde pour leur variation de pH en fonction de l'acide accumulé. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.



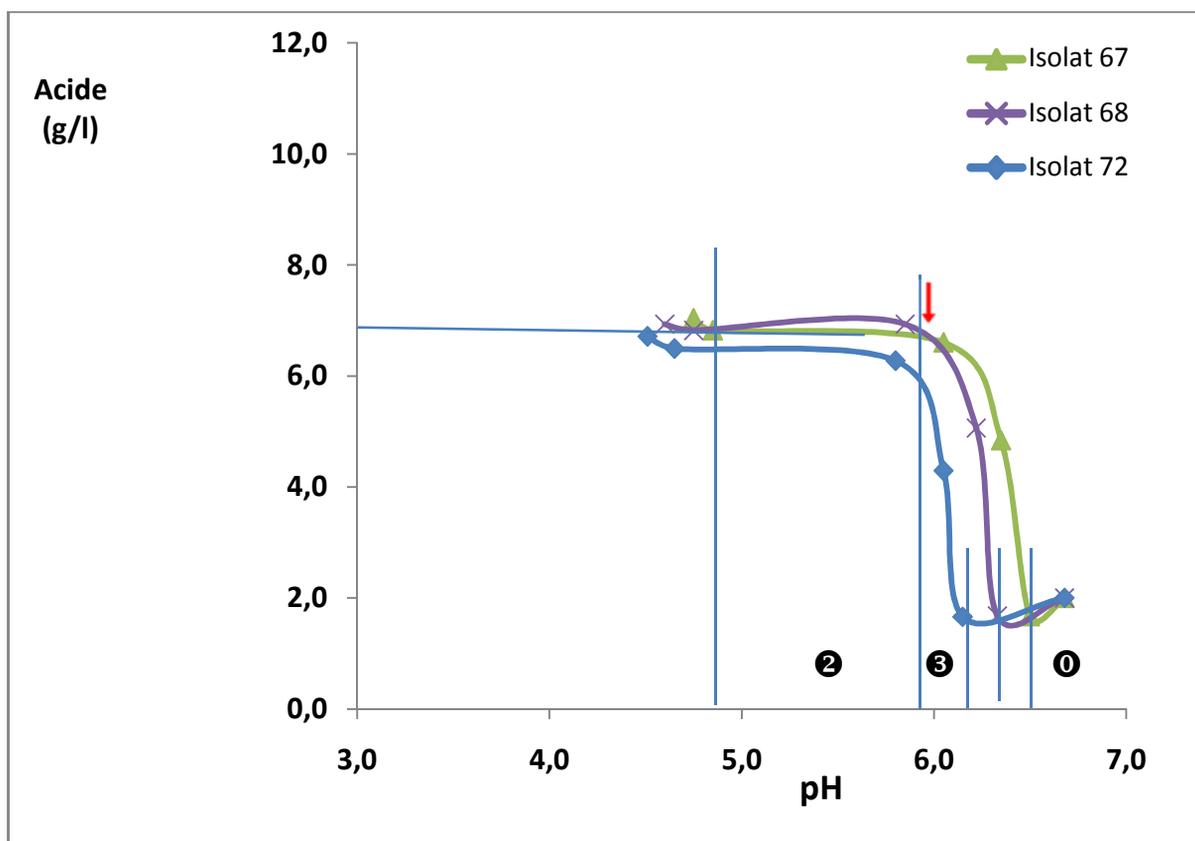
**Figure55** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *E. hirae* de génotype 2. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ② et ③, numéro des phases. Il manque l'isolat 66. Il n'était pas pur. Les isolats 33 et 34 ont montré une réponse typique *L. mesenteroides* subsp. *inconnue*, L'isolat 66 a montré une réponse type *E. faecalis* pour sa variation de pH en fonction de l'acide accumulé. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.



**Figure 56 :** Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *E. sp.* Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ①, ② et ③, numéro des phases. Il manque les isolats 79, 81, 83, 86, 87 et 92. Les données d'acide manquent pour ces isolats. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.

Les valeurs de pH minimales ont été très variées, les plus basses ont été observées pour les isolats d'*E. durans*, avec des pH aux environs de 4,2 et la plus haute pour un isolat d'*E. sp.*, avec un pH de 5,6. Les quantités d'acide produites ont été plus homogènes, aux environs de 5-6 grammes par litre de lait pour la majorité des isolats.

Sur une durée de 24 h à 30 °C, les valeurs de pH n'étaient pas liées de façon linéaire aux quantités d'acides présentes dans le lait. On peut distinguer plusieurs phases, selon la pente de la courbe. Ces phases ont été numérotées de la même façon pour les graphes leuconostocs, entérocoques, lactobacilles et lactocoques. On observe les phases type 0, 1, 2 et 3 pour les isolats d'entérocoques.



**Figure 57** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *E. faecalis*. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ①, ② et ③, numéro des phases. Les isolats 50, 117 et 118 manquent. L'isolat 50 n'était pas pur. L'isolat 50 a montré une réponse typique *E. durans* pour sa variation de pH en fonction de l'acide accumulé. Ils manquent les données d'acide pour les isolats 117 et 118. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,3 % et 0,5 %.

Une phase type 0 a existé chez les isolats *E. durans*, *E. sp.* et *E. faecalis* pendant les deux premières heures environ. Elle n'a pas existé chez les isolats *E. hirae*. Chez ces derniers, la phase initiale a été une phase de type 2 pour les isolats *E. hirae* de génotype 2, pendant quatre heures avec un pH qui est descendu aux environs de 5,0, ou directement une phase de type 3 chez les isolats *E. hirae* de génotype 1.

La phase type 0 a été suivie pendant environ 4 heures d'une phase type 1 chez la majorité des isolats *E. durans*. La phase de type 1 les a mené à un pH d'environ 5,2. Puis la phase de type 1 a été suivie d'une phase de type 3 chez tous les isolats *E. durans*.

La phase type 0 a été suivie d'une phase type 3 chez tous les isolats *E. faecalis*, *E. sp.* et *E. hirae* de génotype 1. Cette phase type 3 les a mené à un pH d'environ 6,0 et a duré de quatre à six heures. Puis la phase de type 3 a été suivie d'une phase de type 2 pendant les 16 à 18 dernières heures.

Chez les isolats *E. hirae* de génotype 2, une phase type 3, deuxième et dernière phase, a débuté à un pH d'environ 5,0 et a duré pendant les 20 dernières heures.

Pour tous les entérocoques considérés, sauf les *E. hirae* de génotype 2, l'ajout d'extrait de levure à 0,3 et 0,5 % au lieu de 0,1 % est associé à des valeurs de pH plus basses au cours de la phase type 3.

### I-3-4-Phénotypes des isolats de lactobacilles

#### ***Phénotypes utilisés pour l'identification phénotypique des isolats***

Les trois lactobacilles identifiés moléculairement dans ce travail n'avaient pas été repérés par identification morphologique/phénotypique. Un des isolats affilié moléculairement à *Lb. plantarum*, l'isolat 106bis, a été pris sur la même boîte que l'isolat 106 affilié moléculairement à *E. hirae*

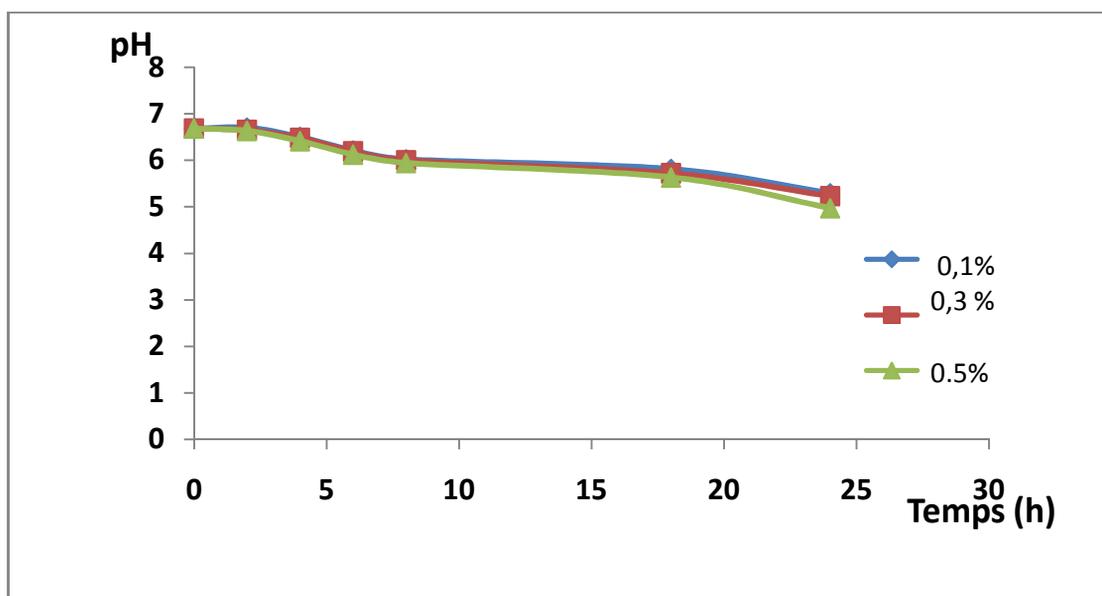
#### ***Capacité acidifiante***

##### *Capacité de coagulation rapide*

Seul l'isolat *L. plantarum* de génotype 1 '110' a eu un pouvoir de coagulation rapide.

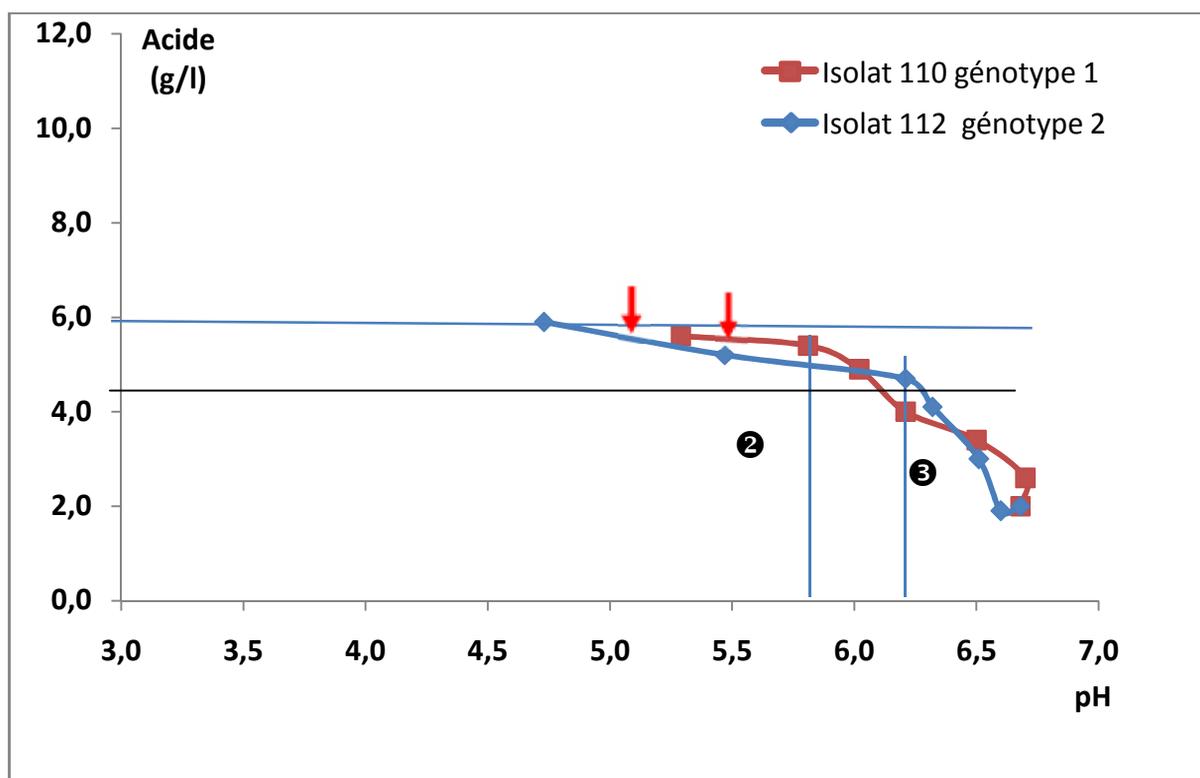
##### *Effet de l'extrait de levure sur la variation du pH en fonction du temps*

L'ajout de 0,5 % au lieu de 0,1 et 0,3 % d'extrait de levure a eu un effet mineur sur la vitesse d'acidification des isolats *L. plantarum* 110 et 112.



**Figure 58:** Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps d'une culture en lait reconstitué (Régilait) de l'isolat *L. plantarum* '110' à 30 °C pendant 24 h. Comme les graphes des deux isolats *L. plantarum* se ressemblent, les graphes d'un seul isolat *L. plantarum* ont été représentés.

Evolution du pH en fonction de l'acide



**Figure 59** : Variation du pH en fonction de l'acide accumulé pendant 24 heures à 30 °C en , lait reconstitué ('Régilait) supplémenté à 0,1 % d'extrait de levures pour les isolats *Lb. plantarum*. Mesures à 0, 2, 4, 6, 8, 18 et 24 heures. ② et ③, numéro des phases.

L'isolat 106bis manque. Il a été découvert ultérieurement, lors des identifications moléculaires, sur la même boîte que l'isolat 106 affilié moléculairement à *E. hirae*. —, période d'impact de l'extrait de levure à 0,5 %.

Les deux isolats de *L. plantarum* ont des courbes similaires, avec une phase de type 3 de six à huit heures suivie d'une phase de type 2 de 14 à 16 heures.

## II-ESSAI DE FABRICATION D'UN FROMAGE TYPE « JBEN »

Des essais de fabrication de fromage *Jben* ont été effectués en utilisant les isolats de la collection obtenue dans l'étude. Les fromages fabriqués correspondent aux fromages *Jben 1* de la figure 35, du fait de l'emploi de présure animale, de lait qui n'est pas cru et de levains acidifiants.

### II.1-Fabrication des fromages

Trois types de fromage ont été fabriqués.

Le premier, appelé fromage « S », a été ensemencé avec le levain constitué des trois isolats 06 / (22 ou 23) / (18 ou 19 ou 20), c'est-dire d'un mélange d'isolats identifiés phénotypiquement comme des *L. lactis*, et identifiés *a posteriori* respectivement comme un isolat *L. mesenteroides* subsp. *inconnue*, et deux isolats *E. durans* et. Après égouttage le caillé était de couleur blanchâtre, à pâte friable, d'une odeur agréable et d'un goût plus ou moins acide.



Figure 60 : Caillé du fromage « S »

Le deuxième, appelé fromage « C », a été ensemencé avec un levain constitué de quatre isolats, les trois précédents plus un isolat, l'isolat 15, identifié *a posteriori* comme *L. lactis*. Une fois coagulé, et avant son égouttage, le caillé s'est séparé du sérum, est devenu boursoufflé et gonflé, et est monté à la surface du récipient; il était de couleur blanche plus ou moins jaunâtre avec des trous, un goût piquant, et une odeur désagréable. Après brassage, le caillé est descendu en bas du récipient et nageait dans le lactosérum.



Figure 61 : Caillé du fromage « C »

Le troisième, appelé fromage « I », a étéensemencé avec les levains fournis par la laiterie de Tlemcen. Le caillé obtenu était blanc, friable, avec des caractéristiques similaires à celles du fromage « S ».

Ainsi le caillé « C » a présenté des défauts dès la fin de la coagulation mais aucune des caractéristiques d'un *Jben*. Pour chercher à identifier les causes de ses défauts, des analyses microbiologiques et des tests d'acidité ont été effectués (cf. II-2- et II.3).

Puisque les fromages S et I ne présentaient pas de défaut majeur de fabrication, des analyses physico-chimiques ont été effectuées pour les comparer (tableau 24).

**Tableau 24** : Analyses physico-chimiques des fromages S et I à 2 jours

Type de fromage		Poids (g)	T (°C)	Acidité (°D)	MG (%)	EST (%)	MG/EST (%)	Humidité (%)
S	Moyenne (n=4)	1430	6,25	88,25	10,2	28,5	35,0	71,5
	Ecart-type		1,7	1,7	0,6	2,5	4,1	2,5
I	Moyenne (n=4)	1780	6,00	88,50	8,9	29,3	33,2	70,8
	Ecart-type		1,8	2,6	2,2	6,7	17,2	6,7

Le poids du fromage I a dépassé celui du fromage S de 350 g (+ 20 %), alors que les deux fromages avaient un EST similaire et que le volume du lactosérum a été de 3020 ml pour chacun des fromages; ceci correspondait à des volumes initiaux de lais mis en œuvre de 4,45 l pour le fromage S, et de 4,8 l pour le fromage I, au lieu des 5 l initialement mis en œuvre. Autrement dit une perte inexplicquée de 4% de matière pour le fromage I et de 13 % pour le fromage S. Seule la variation observée pour le fromage I peut s'expliquer par des erreurs de mesure. On peut supposer qu'il y a certainement eu une perte de caillé au moment de la mise en sac pour le caillé S.

L'acidité titrable correspondait à un pH de 4,3, équivalent pour les deux fromages. Les valeurs d'acidité titrable et de pH étaient similaires à celles décrites pour des *Jben* marocains, respectivement 104 °D et 4,2 (El Marrakchi et Hamama, 1995).

Les taux d'extrait sec étaient conformes à ce qui est attendu pour un *Jben*, car situés aux alentours de 30 %.

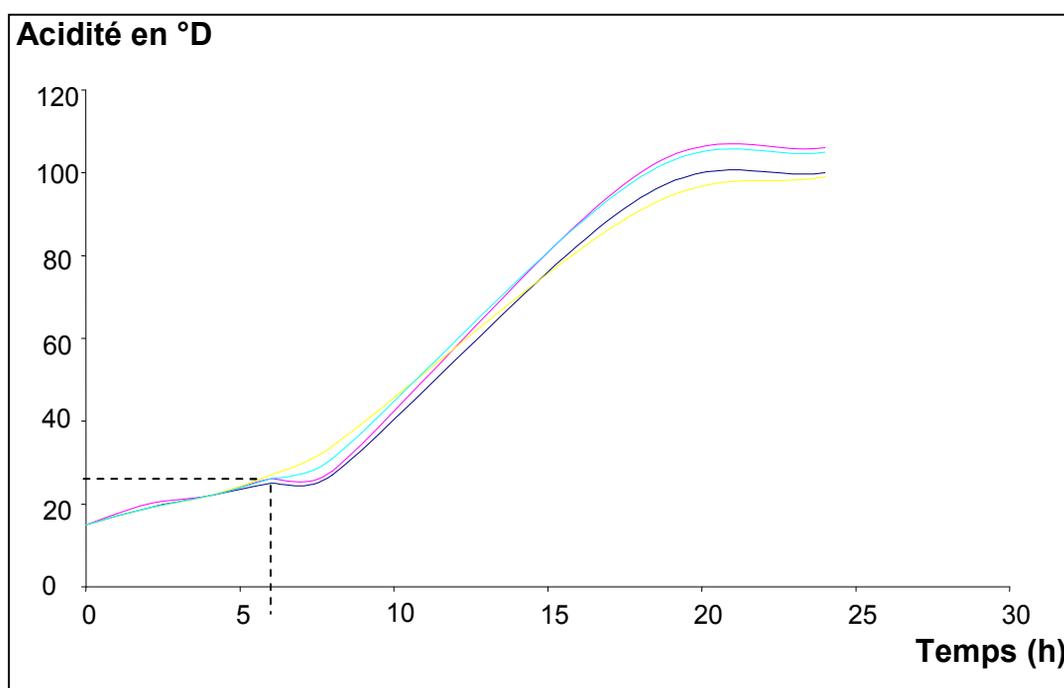
Les taux de matières grasses étaient inférieurs à ceux décrits pour des *Jben* marocains (15% ); El Marrakchi et Hamama, 1995, Hamama et al, 2003), sans doute du fait de l'utilisation d'un lait partiellement écrémé, ayant donc un taux de MG de 1,5 % à 1,8 % au lieu d'un lait entier, avec un taux de MG d'au moins 3,5 % (Hamama et al ; 2003)

Les valeurs moyennes d'extrait sec, de matière grasse et donc de gras sur sec étaient seulement légèrement différentes entre les fromages S et I, le fromage I étant en

moyenne plus sec (+ 1.4 points) et moins gras (- 1,3 points)(tableau 24). Cependant, le fromage I présentait une plus grande hétérogénéité (cf. écart-types plus élevés), c'est-à-dire que I été hétérogène car mal mélangé au départ, peut être lors de l'ajout de la présure. Soit il ya eu des erreurs d'analyses.

## II-2- Tests d'acidité

Les figures 62 - 64 montrent les variations d'acidité au cours du temps pour les cultures des quatre isolats inclus dans les levains, pour les levains S et C, ainsi que pour les caillés S et C obtenus. L'évolution de l'acidité du fromage « I » n'a pas été étudiée.

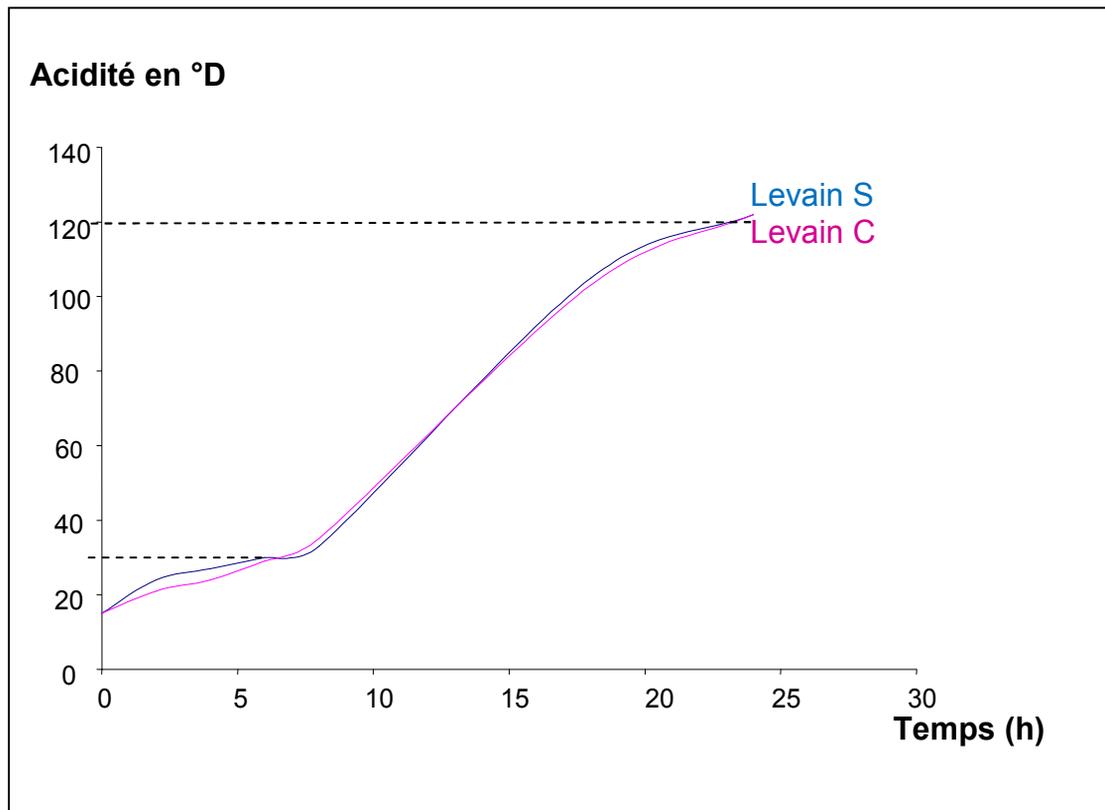


**Figure 62:** Variation de l'acidité au cours du temps de chacun des quatre isolats utilisés pour la fabrication des levains, cultivés dans 100 ml de lait stérilisé partiellement écrémé à 30°C

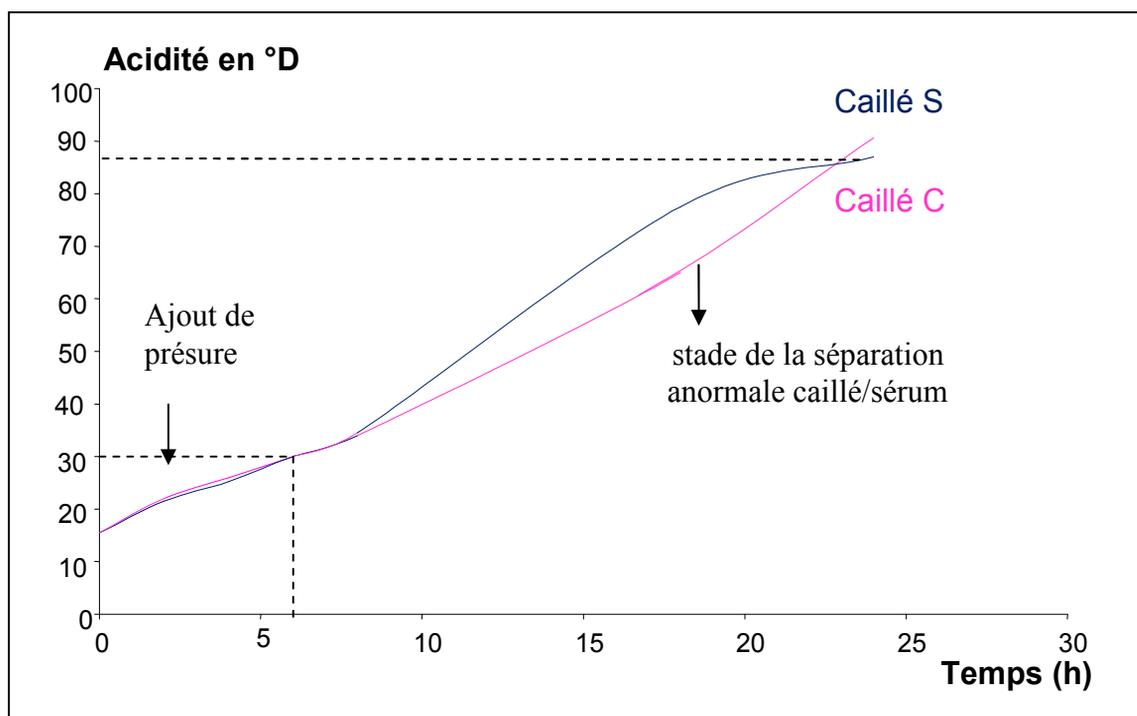
Les valeurs d'acide atteintes après 24 h étaient proches de 100 °D, et les mêmes pour les quatre cultures d'isolats participant aux levains C et S (figure 62). Les cinétiques d'accumulation d'acide étaient similaires à celles d'isolats *L. lactis*, avec deux phases distinctes, dont une phase lente jusqu'à six heures.

De même, les cinétiques d'accumulation d'acide par les cultures de levains S et C (figure 63) étaient similaires à celles d'isolats *L. lactis* (non montrées). Cela indique, qu'à l'époque des fabrications, des souches *L. lactis* étaient bien présentes dans les levains S et C. Néanmoins, ces levains pouvaient aussi être contaminés au moins par *E. durans*, *E.*

*hirae*, et *L. mesenteroides*, ainsi que l'ont révélé les identifications des isolats constitutifs de ces levains faites *a posteriori* par voie moléculaire. La présence de *L. lactis* aux côtés d'autres microorganismes a d'ailleurs été constatée pour l'isolat 15, ainsi que décrit dans la partie résultats, § I.3.2.



**Figure 63** : Variation de l'acidité des levains 'S' et 'C' au cours du temps dans le lait « Régilait » incubé à 30°C.



**Figure 64:** Mesure d'acidité des caillés S et 'C' au cours de la fabrication à partir de lait du commerce pasteurisé et partiellement écrémé.

La quantité d'acide du caillé S a augmenté progressivement au cours du temps jusqu'à atteindre 87 °D à 24 h selon une cinétique similaire à celle du levain S, surtout jusqu'à 6 heures de fabrication, mais elle était toutefois plus faible que celle du levain à 24 heures de fabrication. Le lait utilisé pour la fabrication était donc moins favorable que le lait 'Régilait' à l'activité des lactocoques entre 6 et 24 heures.

La quantité d'acide du caillé C a augmenté comme celle du caillé S jusqu'à huit heures de fabrication, puis elle a augmenté moins rapidement pour atteindre cependant la même valeur à 24 heures; c'est à partir de 18 h qu'il y a eu la séparation anormale du caillé et du sérum décrite au-dessus. L'acidité du sérum C est restée à 65 °D après 24 h de fabrication, alors que celle du caillé C était de 87 °D. Cette cinétique d'acidification du caillé C témoigne d'une activité perturbée des lactocoques dans le caillé au cours de leur deuxième phase d'activité; comme leur activité était normale au cours de la culture du levain C (figure 63) et que le caillé C a été fabriqué en parallèle au caillé normal S à partir du même lait, il était vraisemblable que la perturbation ait été due à une contamination accidentelle du lait ou du caillé C. Des analyses microbiologiques ont été effectuées pour essayer de connaître la cause des défauts du fromage C (cf. § résultats II-3). Les microorganismes responsables auraient produit moins d'acide, mais plus de gaz.

### II-3- Analyses microbiologiques

Il n'y avait aucun *E.coli*, entérocoque fécal, spores de *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, et levures et moisissures cultivables dans les caillés S et C à 24 heures de fabrication.

**Tableau 25:** Analyses microbiologiques des caillés S et C à 24 h heures de fabrication. Nombres de germes en ufc/g

Microflores Caillés	Germes totaux	Entérobactéries	Coliformes
S	1,6.10 <sup>4</sup>	absence	0,3
C	3,5.10 <sup>4</sup>	350	140

Les niveaux de Coliformes du caillé C ont dépassé la norme qui est de 10 UFC/g (arrêté du 21 décembre 1979).

Des tests phénotypiques ont été réalisés pour identifier en genre la bactérie qui était probablement responsable des défauts du fromage C.

Les résultats de l'analyse phénotypique, mobilité « + », production d'acétoine/indole/acides mixtes/glucose/sacharose/lactose « + », et utilisation du citrate « + », laissaient supposer que l'agent probablement responsable des défauts du caillé « C » était une bactérie appartenant au genre *Enterobacter* (voir tableau en annexe II).

D'après la littérature, l'espèce la plus fréquemment responsable de gonflement précoce est l'espèce *Enterobacter aerogenes*, par production de dihydrogène et dioxyde de carbone. Cette espèce est à Gram négatif, anaérobie facultative, citrate positive, peu exigeante au plan nutritionnel et très répandue dans la nature (tractus gastro-intestinal, sol, etc.); elle peut contaminer le lait à la production ou au niveau de la transformation et s'y multiplier surtout après sa maturation (Eck, 1997).

Les deux fromages S et C ont été fabriqués simultanément dans les mêmes conditions. La contamination du fromage C par *Enterobacter* pourrait avoir été due à un ustensile souillé (par exemple la bassine en plastique dans lequel le caillé C a été fabriqué) malgré qu'il ait été soigneusement lavé et nettoyé avant la fabrication.

## II-4-Epreuve sensorielle

Les fromages S et I ont subi une analyse sensorielle ainsi qu'un troisième fromage acheté dans le commerce, appelé fromage « R ».

L'épreuve triangulaire a été appliquée pour l'aspect externe (tableau 26, annexe III) et le goût (tableau 27, annexe III).

**Tableau 26:** Epreuve triangulaire appliquée pour l'aspect externe des fromages

μ théorique 1,64 au seuil de 5 %, 2,33 au seuil de 1 % et 2,81 au seuil de 1 ‰		
Disposition	μ observée	Différence
RRI	5.39	Hautement significative
SSI	5,39	Hautement significative
IIR	2.20	Significative à 5%
RRS	4.33	Hautement significative
IIS	4.33	Hautement significative
SSR	4.86	Hautement significative

Le fromage R avait un aspect externe significativement différent de celui du fromage S quel que fut son rang de présentation, et de celui fromage I surtout lorsqu'il fut présenté après ce dernier. De plus, les fromages S et I avaient un aspect externe significativement différent (tableau 26)

**Tableau 27 :** Epreuve triangulaire appliquée pour le goût des fromages

μ théorique 1,64 au seuil de 5 % ; 2,33 au seuil de 1 %; et 2,81 au seuil de 1 ‰		
Disposition	μ observée	Différence
RRI	0,44	non significative
SSI	- 1,50	non significative
IIR	4,86	significative à 1 ‰
RRS	4,33	significative à 1 ‰
IIS	1,14	non significative
SSR	4,86	significative à 1 ‰

Le fromage R avait un goût significativement différent de celui du fromage S quel que fut son rang de présentation, et de celui du fromage I seulement lorsqu'il fut présenté après ce dernier. Par contre, les fromages S et I avaient un goût similaire (tableau 27).

**Tableau 28** : Epreuve de classement des trois fromages S, I et R

Khi2 théorique 5,99 au seuil de 5% ; 9,21 au seuil de 1 %				
<u>Critères</u>	<u>n</u>	<u>k</u>	<u>khi2</u> observé	<u>Différences</u>
Consistance	16	3	13,50	significative à 1 % R<(S = I)
Acidité	16	3	11,37	significative à 1 % S>I≥R
Arôme	16	3	2,62	non significative
Appréciation générale	16	3	19,5	significative à 1 % R>I=S

Les trois fromages S, I, et R avaient un arôme similaire. Par contre le fromage R a été plus apprécié que les fromages S et I, sans doute à cause de son acidité plus faible, surtout par rapport à celle du fromage S, et de sa consistance.

On peut penser que le taux de matières grasses du fromage R était plus élevé que ceux des fromages S et I, apparemment bas pour des *Jben* ( cf. Résultats II-1), conduisant à une meilleure onctuosité et souplesse du fromage R, donc à des fromages moins consistants plus appréciés des dégustateurs. On peut aussi penser que le fromage R avait été salé, conduisant, pour une même acidité titrable, à des fromages moins acides à la dégustation (Hamama et al,2003), ou bien que le fromage R avait moins d'acidité titrable.



# Partie 4

***DISCUSSION***

***ET***

***CONCLUSION***

## DISCUSSION

Ce travail avait pour objectif d'isoler, caractériser et sélectionner des souches de LAB appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus*, et capables d'être utilisées pour obtenir des laits fermentés type '*Lben*' et des fromages frais type '*Jben*'. Les travaux faits à la fin du siècle dernier et au tout début de celui-ci avaient montré l'abondance des leuconostocs et des lactocoques dans les laits et fromages frais traditionnellement fermentés en Afrique du Nord et Moyen-Orient (Benkerroum et Tamine, 2004). Ces produits sont largement consommés en Algérie et sont obtenus traditionnellement en milieu rural par une fermentation de lait cru, dès sa collecte, à température ambiante par des LAB mésophiles acidifiantes. Les conditions de fabrication du *Lben* et du *Jben* se sont beaucoup modifiées au cours de ces dernières années, au risque de perdre les caractéristiques des produits traditionnels, du fait de l'urbanisation et de l'industrialisation des fabrications. D'une fabrication traditionnelle à partir de lait de brebis ou chèvre cru, coagulé par des préparations de plantes et fermenté par les microorganismes présents dans le lait cru, on est passé ainsi progressivement à une fabrication majoritairement à partir de lait de vache ayant subi un traitement thermique, coagulé avec de la présure animale commerciale et fermenté avec des levains commerciaux produits par les grands fournisseurs mondiaux de levain. Au Maroc, les levains utilisés dans les zones urbaines sont mêmes des LAB thermophiles, celles utilisées pour produire les yaourts (Benkerroum et Tamine, 2004).

### **Constitution de la collection d'isolats leuconostocs et lactocoques**

Ce travail a permis d'obtenir une collection de 84 isolats dont 38 % issus de laits crus de vache, de chèvre et de brebis et 62 % issus de laits spontanément fermentés de brebis, de chèvre, de jument et de chamelle (tableaux 19, 20). L'identification phénotypique a montré que tous les isolats sont des bactéries à Gram positif et ne possèdent pas l'enzyme catalase. Tous étaient des coques, sauf trois isolats, issus de laits de chamelle fermentés sur milieu MRS-vancomycine, qui se sont révélés être des *Lb. plantarum*.

Les entérocoques ont été isolés involontairement et fréquemment (57 % des isolats) à partir des laits crus et fermentés sur milieu MRS-vancomycine et milieu M17, et de tous les types d'échantillons sauf du lait fermenté de chèvre. Leur isolement à partir du milieu M17 pour 50 % d'entre eux était prévisible dans la mesure où les entérocoques pouvaient être à des niveaux de cellules cultivables similaires à ceux des lactocoques ou de toute autre microflore pouvant se développer sur ce milieu; leur isolement pour la seconde moitié d'entre eux à partir du milieu (MRS + 20 mg/L vancomycine) a été une surprise, car cela signifie que ces entérocoques avaient acquis avant leur isolement une résistance à la vancomycine. Ces 50 % d'entérocoques (24 isolats) sont affiliés, sauf 2 isolats, à deux des quatre espèces

d'entérocoques isolées (*E. sp.* et *E. hirae*). Or l'augmentation du nombre de souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine rend le traitement d'infections nosocomiales à entérocoques chez l'homme de plus en plus difficile (Fisher and Phillips, 2009). De plus, l'isolement d'entérocoques montre que la procédure suivie pour l'isolement des leuconostocs, enrichissement dans un bouillon MRS-vancomycine puis sélection des bouillons présentant un dégagement gazeux, ne permet pas d'éliminer la présence d'autres microflores présentes dans les laits et cultivables sur ce bouillon. Toutes les microflores présentes dans les laits crus et fermentés et capables de se développer dans le bouillon MRS-vancomycine peuvent devenir dominantes. Parmi les populations capables de se développer dans ce bouillon, figurent les entérocoques ayant acquis la résistance à la vancomycine et les espèces de lactobacilles mésophiles, dont des espèces hétérofermentaires stricts, qui sont des microflores courantes dans les laits crus et fermentés. Soit ce sont bien les leuconostocs qui ont produit le gaz, mais ils étaient à un stade auquel beaucoup n'étaient pas cultivables ensuite sur gélose MRS-vancomycine, et ce sont les entérocoques devenus résistant à la vancomycine qui, s'étant développés en parallèle, ont été isolés; soit c'était d'autres bactéries lactiques hétérofermentaires strictes que les leuconostocs comme certaines espèces de lactobacilles qui ont produit le gaz, et, dans ce cas la sélection de coques a sélectionné les coques qui pouvaient se développer en parallèle sur le milieu, en l'occurrence les entérocoques.

Les leuconostocs ont pu être isolés dans les 4 des 5 types de laits fermentés et crus dans lesquels ils ont été recherchés (les 4 types de laits sont les laits de vache crus, et laits de brebis, chèvre, et chamelle fermentés, le cinquième est les laits de jument fermentés).

Les lactocoques ont été recherchés dans trois types de lait cru et deux types de lait fermenté mais ils n'ont pu être isolés que de laits de jument fermentés et d'un lait cru de vache. Ceci peut être du soit à a/ leur absence dans les autres laits, b/ leur nombre moins élevé que les entérocoques lorsque ces derniers étaient présents dans les autres laits, ou c/ leur manque de cultivabilité dans tous les autres laits. L'hypothèse c/ est plausible pour les laits fermentés, car on sait que les lactocoques sont des microorganismes fréquents dans les laits crus (Gaya et al, 1999) qui se développent bien dans les laits fermentés. Par contre les lactocoques deviennent majoritairement non cultivables lorsqu'ils sont en phase stationnaire de croissance dans du lait de vache, ce qui correspondait sans doute à leur état dans les laits fermentés de chèvre et de chamelle, mais pas de jument; dans ces derniers, les lactocoques auraient eu une croissance moins avancée ou un état physiologique meilleur, du fait de la composition particulière de ces laits; ces laits fermentés étaient déjà caractérisés par l'absence d'isolement de leuconostocs, ce qui suggère une composition de lait moins favorable à la croissance des bactéries lactiques, tout particulièrement visible pour des bactéries exigeantes comme le sont les leuconostocs. Dans les laits crus, les lactocoques

pourraient avoir été stressés par la période de conservation à 4°C préalable à leur isolement et n'auraient ainsi pas pu cultiver sur le milieu M17. Ce n'aurait pas été le cas des leuconostocs et des entérocoques. On sait que les leuconostocs sont particulièrement résistants à des conditions hostiles, surtout à pH 6,5 en présence de calcium et sodium (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004) ainsi que les entérocoques qui sont capables de croître à 7 °C (Foulquie Morena et al., 2006). La moindre résistance des lactocoques aux conditions de conservation du lait aurait aussi pu entraîner un retard de leur croissance au cours de la fermentation spontanée des laits, au profit des entérocoques conduisant à la situation correspondant à l'hypothèse b au dessus. Pour augmenter les chances d'isoler des lactocoques, il faudrait donc réaliser les isollements à partir de laits crus ayant subi le moins de stress thermique possible, et à partir des laits fermentés en début d'acidification. Il faudrait sans doute aussi nettoyer de façon mesurée les mamelles avant la prise d'échantillon de lait le nettoyage, étant un stress pour les bactéries et diminuant le niveau de contamination du lait (Michel, 2011).

Tous les isolats ont utilisé le lactose et le galactose.

### **Identification des isolats de la collection**

L'identification réalisée pour ce travail est basée sur l'analyse des séquences d'ADN par une technique PCR non spécifique, la Rep-PCR, utilisant les trois types d'amorces REP, ERIC et (GCG)<sub>5</sub>, suivies de techniques PCR spécifiques de genre, espèces et sous-espèces. Ces techniques nécessitent un matériel dédié et un savoir-faire, et ont été réalisées dans un laboratoire (URTAL, INRA Poligny, France) dans lequel elles sont implantées et utilisées en routine depuis une dizaine d'années, au cours d'un stage de quatre semaines qui m'a permis de m'initier à ces techniques. L'identification moléculaire a permis d'identifier les isolats de façon fiable, faisant de ce travail une exception, avec celui d'Ouadghiri et al. (2009), pour caractériser les LAB de laits crus et produits laitiers d'Afrique du Nord. Comme indiqué dans la partie bibliographique, on peut ainsi, ce qui n'est pas possible par des méthodes phénotypiques, différencier les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* de *Lc. lactis*, différencier à coup sûr les entérocoques des autres coques à Gram positif et catalase négative, identifier les entérocoques jusqu'à l'espèce, et distinguer les *L. mesenteroides* des *L. pseudomesenteroides*. Aussi, nous ne comparerons nos résultats qu'avec ceux publiés par Ouadghiri et al, (2009). Dans ce travail, l'identification selon les caractéristiques phénotypiques type fermentaire, croissance en présence de 6,5 % de NaCl, et à 45 °C, et utilisation de sucres, a conduit à affilier les isolats à *Lc lactis* plutôt qu'à *E. spp.*

Quatre-vingt dix pour cent des isolats ont été affiliés à sept espèces et sous-espèces de bactéries lactiques mésophiles appartenant à quatre genres, à savoir : *Enterococcus* (48 isolats; *E. hirae* (21), *E. durans* (13), *E. faecalis* (7), *E. sp.* (7)), *Leuconostoc* (15 isolats, *L.*

*mesenteroides*, dont 3 subsp. *dextranicum*, 3 subsp. *mesenteroides* et 9 subsp. *inconnue*), *Lactococcus* (11 isolats, *Lc. lactis* subsp. *lactis*) et *Lactobacillus* (3 isolats, *Lb. plantarum*) (figures 37, 38 ; tableau 20).

L'espèce *E. hirae* a été la plus fréquemment isolée, à partir de 4 des 7 types d'échantillons, lait de brebis et chèvre crus et laits de chamelle et brebis fermentés. *E. hirae* est donnée pour une espèce moins fréquente qu'*E. faecium* et *E. faecalis* dans les produits laitiers par Foulquie Moreno et al. (2006), malgré le fait qu'elle est fréquemment isolée de la microflore intestinale de nombreuses espèces domestiques (Euzéby, 1997). Ceci pourrait être dû à la procédure d'isolement particulière utilisée dans ce travail, qui comporte une étape d'enrichissement en milieu liquide. On peut imaginer que cette espèce, bien que moins abondante dans les laits que les autres espèces d'entérocoques isolées, ait rattrapé son retard au cours de la phase d'enrichissement. On ne peut aussi exclure que cette espèce soit de plus en plus citée, non pas parce qu'elle serait nouvellement apparue dans les produits laitiers, mais parce que les techniques d'identification actuelles permettent de ne plus la confondre avec les espèces phylogénétiquement proches *E. faecium* et *E. durans*. C'est le cas de la technique Rep-PCR utilisée dans ce travail. Par ailleurs, une espèce d'entérocoques, proche d'*E. faecium*, inconnue dans les produits laitiers au moment du travail, a été isolée. C'est la combinaison des résultats Rep-PCR et PCR spécifique du genre *Enterococcus*, cette dernière technique étant décrite par Bendimerad et al. (2012), qui a permis sa mise en évidence. Il faudrait voir s'il s'agit de la nouvelle espèce appartenant au groupe *faecium*, *E. lactis*, isolée de produits laitiers et décrite en 2011 (Morandi et al., 2011). Dans les laits crus de vache, *E. durans* a été la seule espèce isolée dans ce travail alors que c'était *E. faecium* qui dominait à 58 % dans les laits étudiés par Ouadghiri et al. (2009). Les différences dans les procédures d'isolement, comme suggéré pour *E. hirae*, pourrait expliquer ces différences. Plus largement, la procédure d'isolement utilisée dans ce travail pourrait aussi expliquer pourquoi l'espèce *E. faecium* n'a jamais pu être isolée à partir des 7 types de lait. Les isolats *Enterococcus* se sont développés dans un milieu à 3 et 4% de NaCl, seule l'espèce *E. faecalis* a toléré un milieu à 6,5% de NaCl.

Tous les lactocoques isolés sont des *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Quatre génotypes différents ont été obtenus pour les isolats *Lc. lactis*. Les 15 isolats lactocoques représentent donc 4 souches présentant de grandes différences de potentiel génétique

Les isolats leuconostocs identifiés appartiennent à une seule espèce, *L. mesenteroides* qui est l'espèce la plus fréquemment isolée de produits laitiers français (Cibik et al., 2000.) Par contre l'espèce *Leuconostoc pseudomesenteroides* n'a jamais été isolée au cours de ce travail, y compris de laits de vache crus, alors qu'elle était présente, au côté de l'espèce *L. mesenteroides*, dans des laits de vache crus marocains (Ouadghiri et al, 2009).

D'après leur profils Rep-PCR, les isolats sont génotypiquement apparentés à deux des sous-espèces de l'espèce *L. mesenteroides*, les sous-espèces *mesenteroides* ou *dextranicum*, mais aussi à une troisième sous-espèce, nommée dans ce travail *inconnue*, qui ne correspond pas à la sous-espèce *cremoris* connue. Quatre génotypes ont été obtenus pour les isolats *L. mesenteroides*. Les 11 isolats leuconostocs représentent donc 4 souches présentant de grandes différences de potentiel génétique. Tous les isolats *L. mesenteroides* ont produit du dextrane en particulier les isolats *Leuc mesenteroides* subsp *inconnue*, ce qui confirme l'appartenance de ces derniers à une autre sous-espèce que la sous-espèce *cremoris* qui n'en produit pas. Il faudrait voir si cette troisième sous-espèce correspondrait à la sous-espèce *suionicum* décrite en 2012 (Gu et al., 2012), qui était auparavant assimilée à la sous-espèce *mesenteroides*, et qui donc produit vraisemblablement du dextrane même si cela n'est pas spécifié. Sept génotypes (A2, 3, 4, 6, et 12) de coques sont restés non identifiés car leurs profils Rep-PCR se regroupaient à moins de 40 % d'homologie avec les profils de référence de la souchothèque. Donc, il ne s'agit ni de *Streptococcus gallolyticus/thermophilus/agalactiae/lutetiensis/infantarius*, ni de *Pediococcus cidilactici/pentosaceus/damnosus*, et ni de *Lc. garviae*, *Leuc. pseudomesenteroides* et *Weissella confusa/halotolerans/kandleri/minor/paramesenteroides*. Il faudrait séquencer leur rDNA 16S de manière à pouvoir les identifier, puis enrichir la banque de profils Rep-PCR de leurs profils.

### **Diversité génotypique des isolats de la collection**

Ce travail a cherché à maximiser l'isolement de souches différentes, en analysant des laits fermentés qui n'étaient pas issus des laits crus analysés, en multipliant le nombre d'exploitations analysés (40 exploitations) tout en minimisant le nombre de laits pour une même exploitation (2 en moyenne) et en multipliant le type de laits analysés (7 types), et en prélevant peu d'isolats pour un même lait. Dans ces conditions, vingt et un génotypes ont été observés pour les 84 isolats issus des 79 laits, un nombre restreint par rapport au nombre de laits analysés avec en moyenne un génotype pour 4 isolats. et un génotype pour deux exploitations. La diversité en espèce et sous-espèce (9 espèces et sous-espèces connues + 5 espèces inconnues) représente déjà 14 génotypes différents, les 7 génotypes restant représentent donc la diversité intra-espèce ou intra-sous-espèce, principalement retrouvée pour les lactocoques et les entérocoques. La diversité en genre et espèces ne peut pas être discutée selon le type d'échantillon, ce n'était d'ailleurs pas le but du travail, car a/ les isollements n'ont pas été faits systématiquement sur les deux milieux et sur tous les types d'échantillon possible, et b/ le nombre d'échantillon a été variable selon les milieux et les types de lait. Pour cette discussion, il manque les laits de chamelle et jument crus et les laits de vache fermentés, et des isollements en milieu M17 pour les laits de chèvre et de brebis

fermentés, et des isolements sur milieu MRS pour les laits de chèvre et de brebis crus. La diversité intra espèce/sous-espèce semble dépendre du nombre d'isolats obtenus pour chaque espèce/sous-espèce plus que de la diversité des types de lait. Ainsi, les 10 isolats *Lc. lactis* subsp. *lactis* issus d'un seul type de lait (lait de jument fermenté) ainsi que les 21 isolats d'*E. hirae* issus de 4 types de lait (laits de brebis et chèvre crus, laits de chamelle et brebis fermentés) présentent trois génotypes différents, et les 13 isolats d'*E. durans* issus de 3 types de lait (laits de vache et de brebis crus, un lait de brebis fermenté) présentent 2 génotypes différents non superposés aux types de lait, alors que les 7 isolats d'*E. faecalis* issus de trois types de lait (lait de brebis et chèvre crus, et lait de chamelle fermentés) et les 7 isolats d'*E. sp* issus de 2 types de lait (laits de jument et de brebis fermentés) présentent un seul génotype. Pour les isolats de *L. mesenteroides* issus de 4 types de lait (laits de brebis, chèvre et chamelle fermentés, et laits de vache crus), la diversité intra sous-espèce semble faible pour la sous-espèce *inconnue*, avec un seul génotype pour 9 isolats issus de 2 types de laits (laits de vache crus et laits de brebis fermentés). On ne peut rien dire des sous-espèces *mesenteroides* et *dextranicum*, du fait du faible nombre d'isolats associés à chacune (3 isolats).

### **Caractérisation technologique des isolats de la collection**

Les mélanges *Lc. lactis* et *L. mesenteroides* présentent un intérêt potentiel en fabrication (cf. biblio ; § II.4). Les entérocoques isolés au cours de ce travail présentent trop de risque en fabrication à cause de la résistance avérée à la vancomycine de certains, (la présence ou non de cette résistance reste à contrôler pour les autres); par ailleurs les entérocoques qui seraient dépourvues de résistance à la vancomycine ne présentent tout de même pas un potentiel d'acidification suffisant à 25 °C et 30 °C, comparé aux lactocoques. *Lb. plantarum* n'est jamais utilisé comme levain starter mais comme levain auxiliaire en cas d'affinage (Beresford al, 2001). Malgré tout, tous les isolats ont été caractérisés pour des potentiels technologiquement important pour des starters : capacité à utiliser le citrate, à acidifier le lait, et à accumuler des acides dans le lait, supplémenté ou non en extrait de levures. Les isolats *Lc lactis* et *L. mesenteroides* ont aussi été caractérisés pour leur capacité à acidifier à différentes températures pouvant être rencontrées en fabrication.

Les isolats possèdent des potentialités à acidifier le lait et à accumuler des acides dans le lait, différentes d'abord selon leur espèce, puis ensuite selon leur sous-espèce lorsqu'elles existent, et enfin selon l'isolat. Ainsi, on obtient des graphes caractéristiques d'espèce, et sous-espèce, lorsque l'on représente l'acidité titrable du lait en fonction du pH du lait pour chaque isolat cultivé pendant 24 heures sur lait, c'est-à-dire les principales activités métaboliques de chaque isolat au début de la fermentation du lait. Ces graphes sont donc très intéressants pour visualiser et typer ces potentialités métaboliques.

Comme attendu, en culture sur lait de vache, les *Lc. lactis* subsp. *lactis* sont globalement meilleurs acidifiants et accumulateurs d'acides que les *L. mesenteroides*, et la supplémentation en extrait de levures du lait de vache stimule surtout l'acidification par les *L. mesenteroides*. Les lactocoques ont ainsi produit en moyenne 3 fois plus d'acides que les leuconostoc et ont acidifié le lait en dessous de pH 5,0. De ce fait, les *Lc lactis* ont été capables de coaguler le lait de vache en moins de 18 heures (résultats § I-3-2).

Il existe des potentialités acidifiantes différentes entre les isolats *Lc. lactis* subsp. *lactis* selon leur génotype, l'isolat de génotype 3 présentant une acidification nettement plus faible et nécessitant l'ajout d'extrait de levures au lait pour acidifier aussi bien que les 9 isolats de génotypes 1 et 2. Cela est cohérent avec la distance entre les génotypes, le génotype 3 étant éloigné des génotypes 1 et 2, proches. Cela signifie que l'isolat de génotype 3 est plus exigeant d'un point de vue nutritionnel que les isolats de génotypes 1 et 2. Une exigence nutritionnelle supérieure est un handicap pour assurer l'acidification correcte de laits pauvres. Cet isolat ne peut pas donc pas être retenu comme starter potentiel.

De façon intéressante, il existe des différences de réponse à la température entre les isolats de génotypes 1 et 2 et la souche type de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, les isolats de la collection acidifiant nettement mieux à 42 °C. Cette réponse inhabituelle à la température a déjà été trouvée pour des souches de *Lc. lactis* isolées de laits de chamelle algériens par Drici et al. (2010) pour une température allant jusqu'à 50 °C, qui n'a pas été testée dans ce travail. On peut penser que cela tient à la meilleure tolérance aux stress observée pour les *Lc. lactis* issus récemment de végétaux, ce qui est le cas des isolats de la collection, comparativement aux isolats ayant subi de nombreux repiquages, en particulier sur lait, ce qui est le cas de la souche type (cf. biblio ; § II.5). Pour éviter la perte de cette caractéristique qui peut être intéressante en fabrication, il faut donc éviter les repiquages successifs des isolats *Lc. lactis* de la collection. Les souches de lactocoques de génotypes 1 et 2 pourraient également posséder une auxotrophie pour un plus faible nombre d'acides aminés et des potentialités de formation d'arôme supplémentaires par rapport aux lactocoques utilisés depuis longtemps en fabrication fromagère, comme les lactocoques de nombreux levains commerciaux (cf. biblio ; § II.5), qu'il serait intéressant d'explorer. Au cours de repiquages successifs en lait de *Lc lactis* issus de végétaux, on remarque, associée à la perte de certaines fonctions et à l'acquisition d'autres fonctions, une augmentation progressive de la vitesse d'acidification du lait (Bachmann et al., 2012). Cela veut dire que les produits laitiers fabriqués avec des *Lc. lactis* issus de végétaux, comme c'est le cas pour les laits acidifiés spontanément, ont sans doute des caractéristiques qui ne peuvent pas être reproduites en utilisant des *Lc. lactis* adaptés au milieu lait depuis de nombreuses

génération, comme c'est le cas des *Lc lactis* associés aux levains. Les isolats *Lc lactis* de la collection de génotype soit 1 soit 2, dans la mesure où ils conserveraient leurs éventuelles caractéristiques 'végétales', pourraient donc être utilisées avantageusement comme levains acidifiants pour la fabrication du *Lben* et de ses produits dérivés.

Sur les graphes *Lc. lactis* de l'acidité titrable en fonction du pH (figure 47), on remarque deux types de phase, une phase en début et en fin de culture pendant laquelle le pH diminue fortement relativement à la quantité d'acide titrable, et une phase intermédiaire pendant laquelle l'augmentation importante de la quantité d'acide titrable ne modifie que faiblement les valeurs de pH. La phase 1 a lieu à la période de culture pendant laquelle les lactocoques consomment généralement les peptides et les acides aminés initialement présent dans le lait. Ce faisant, il consommerait aussi une (des)bases présente dans le lait, d'où la diminution importante du pH observée avec une production nette d'acide faible voir nulle. En termes de nombre de lactocoques, la phase 1 correspondrait à une phase de latence ou de multiplication lente, Après avoir déplété le lait, au-dessous d'un certain niveau, de ses acides aminés et peptides présents initialement, les lactocoques induisent la synthèse de leur protéase de paroi afin de se procurer les petits peptides nécessaires à leur croissance (cf. biblio § II.5). Tous les isolats de ce travail présentaient une activité protéasique. La présence de cette activité protéasique serait responsable de la présence de la phase 3. Grâce à leur activité protéasique, tous les isolats auraient pu produire, simultanément et à une vitesse très élevée, une importante quantité d'acides et de bases, puisque les valeurs de pH, de 5,5 à 5,7, restent stables au cours de cette phase. En effet, ce maintien des valeurs de pH ne peut pas être du à la capacité tampon du lait vis-à-vis de l'acidité à ces pH. En effet, les valeurs de pH similaires varient fortement pour des quantités d'acidité titrable moindre pour les leuconostocs par exemple. En terme de nombre de lactocoques, la phase 3 correspondrait à la phase exponentielle observée après induction de l'activité protéasique. La phase 3 ne dure que très peu de temps (2 à 3 heures) car très vite des facteurs en excès dans le lait immédiatement après induction de l'activité protéasique deviennent limitants pour les activités des lactocoques. C'est pourquoi une phase 1 s'installe à nouveau, avec consommation de bases excédant leur production, et une production nette d'acide ralentie. En terme de nombre de lactocoques, cette deuxième phase 1 correspondrait à la phase de ralentissement puis à la phase stationnaire, au cours de laquelle les cellules ne se multiplient pratiquement plus à cause de facteur(s) limitants dans le lait, mais continuent à être métaboliquement actives, en particulier vis-à-vis des acides aminés (Ganesan et al, 2007). Après la phase 1, on devine pour certains isolats le début d'une nouvelle phase au cours de laquelle les isolats ont produit beaucoup plus de base(s) que d'acide si bien que les valeurs de pH sont remontées C'est le début de la dégradation de l'arginine, possible lorsque la concentration en lactose passe au-dessous d'une certaine

valeur. La remontée de pH au cours de cette phase est due à la production de beaucoup d'ammoniac (la remontée des valeurs de pH est exploitée pour mettre en évidence l'utilisation d'arginine, cf. M & M ; § V.3).

Les isolats *L. mesenteroides* présentent les caractéristiques d'acidification attendues (cf. biblio, § II.4). De plus, les isolats affiliés aux sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides* présentent des caractéristiques d'acidification similaires à celles des souches type de ces sous-espèces. Ce travail a permis de mettre en évidence un sous-ensemble de *L. mesenteroides* qui présente des caractéristiques génotypiques distinctes de celles des trois sous-espèces connues au moment de la réalisation de ce travail, d'où leur affiliation à sous-espèce *inconnue* (cf. discussion, § identification moléculaire). Par contre, les graphes acidité titrable en fonction des valeurs de pH et le comportement vis-à-vis de la température de culture de la sous-espèce *inconnue* sont très similaires à ceux de la sous-espèce *dextranicum*. Ce sont les isolats de la sous-espèce *mesenteroides* qui sont différents à la fois de ceux des sous-espèces *dextranicum* et *inconnue*. La sous-espèce *mesenteroides* répond mieux que les deux autres à l'ajout de 0,3 % d'extrait de levure au lait de vache, ce qui est cohérent avec les exigences nutritionnelles moindres de cette sous-espèce (Garvie, 1986). Cette sous-espèce pourrait donc être bien adaptée, en co-ensemencement avec des lactocoques, pour fermenter des laits de brebis et de chamelle, qui sont donnés pour des laits plus riches que les laits de vache et chèvre (Abu-Tarboush 1994; Park et al. 2007) notamment en vitamines comme la vitamine B3 (acide nicotinique) que les leuconostocs exigent dans le milieu de culture (cf. biblio, § II.4). Les isolats de la sous-espèce *mesenteroides* présentent un seul génotype et ont tous été isolés de lait de chamelle, ce qui suggère l'existence d'une souche *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* de la collection pouvant être intégrée dans un levain pour fabriquer du *Lben* et ses produits dérivés.

#### *Remarque*

Quelques isolats n'étaient pas purs au moment de leur caractérisation phénotypique, malgré deux isolements successifs. La présence d'isolats insuffisamment purifiés a été mise en évidence à la fin du travail, au moment de l'identification moléculaire pour laquelle un étalement sur milieu gélosé a été réalisé, suivi de la sélection d'une colonie. C'est comme cela que 2 types de colonies ont été isolées à partir du tube congelé 106, correspondant à *Lb plantarum* et *E. sp.* De même, certains des isolats utilisés pour les fabrications fromagères (06, 15, 18 ou 19, et 20, 22 ou 23) n'étaient pas purs. Ils contenaient bien des cellules de *Lc. lactis* au moment des fabrications, au vu de leur profil d'acidification individuel et des profils d'acidification des caillés. Par contre, au vu des identifications moléculaires, la présence lors des fabrications de cellules d'entérocoques, appartenant à *E. hirae*, *E. durans*

et *L. mesenteroides*, ne peut être exclue. Il s'est avéré très difficile d'obtenir ces isolats purs, même après l'isolement supplémentaire pour l'identification moléculaire. Les profils Rep-PCR obtenus étaient atypiques car ils résultaient du mélange en proportion plus ou moins importante des profils caractéristiques de deux espèces. Pouvoir repérer des isolats non purs est un intérêt supplémentaire de la Rep-PCR à côté de celui de permettre d'identifier et de typer les isolats.

### **Fabrications fromagères**

Des essais de fabrication de fromage type « pâte fraîche » ont été réalisés dans notre laboratoire. Il s'agit de fabrication de *Jben* type « 1 » de la figure 35, c'est-à-dire fabriqué selon une procédure industrielle avec ajout de levains acidifiants, de présure animale et à partir de lait ayant subi un traitement thermique. Trois fromages ont été fabriqués, deux en même temps et dans les mêmes conditions, en utilisant des levains issus de la collection d'isolats. Le premier, appelé S, a étéensemencé avec une culture mixte contenant trois isolats dont l'identification a varié entre le moment de la fabrication et le moment de l'identification moléculaire, d'une identification *Lc. lactis*, à une identification *Enterococcus durans* et *L. mesenteroides* selon les isolats (cf. plus haut). Les cellules *Lc lactis* avaient un biovar *diacetylactis*. Le second, appelé C, a étéensemencé avec quatre isolats, les trois cités précédemment pour le fromage S et un quatrième appartenant à l'espèce *Lc. lactis* au moment de la fabrication et de l'identification moléculaire, mais certainement contaminé par *E. hirae* au vu des profils Rep-PCR obtenus avant une purification satisfaisante. Le troisième fromage a été obtenu en utilisant des levains commerciaux composés d'après le fournisseur de *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, et *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Il s'agit du fromage « I ». Un incident de fabrication, identifié comme étant dû à la contamination et à l'activité de bactéries du genre *Enterobacter* s'est produit pour le fromage C, qui a conduit à son élimination des analyses physico-chimiques et sensorielles.

Les fromages I et S avaient à 48 heures de fabrication des valeurs d'EST, de pH et un taux d'acidité titrable comparables à celles mesurées pour des *Jben* marocain (El Marrakchi et Hamama, 1995, Hamama, 2003) Par contre, ils étaient moins gras, sans doute à cause de l'utilisation de lait partiellement écrémé au lieu de lait entier. Les fromages I et S ont été comparés entre eux et à un fromage R acheté dans le commerce d'un point de vue sensoriel. Sur 5 des 6 critères considérés, les fromages I et S fabriqués au laboratoire se distinguaient du fromage commercial R; ces critères étaient l'appréciation générale, l'aspect externe, la consistance, le goût, et l'acidité, les fromages fabriqués au laboratoire étant moins appréciés, plus acides et de consistance plus élevée. Le fromage R différait plus du

fromage S que du fromage I ; le fromage R avait un goût différent de celui du fromage I seulement lorsqu'il fut présenté après ce dernier, et avait une acidité proche de celle du fromage I, légèrement inférieure tout de même. Les fromages S et I ne se différenciaient pas du fromage R pour l'arôme. Par ailleurs, 2 des 6 critères considérés différenciaient le fromage S du fromage I, l'aspect externe et l'acidité, avec plus d'acidité pour le fromage S. Ainsi, la saveur acide semble positivement liée à un goût différent, moins apprécié. Par ailleurs, la meilleure appréciation du fromage R semble liée à sa saveur moins acide mais surtout à sa consistance moins élevée.

Pour une saveur acide acceptable, Il semble important de fabriquer le *Jben* avec un mélange des sous-espèces *cremoris* et *lactis* de *Lc lactis*, avec deux souches de la sous-espèce *lactis* dont seulement une présentant le biovar *diacetylactis*, comme le mélange du levain commercial ayant servi à fabriquer le fromage I, et non pas avec un mélange de souche ou une souche *Lc lactis* biovar *diacetylactis* comme le mélange ayant servi à fabriquer le fromage S. En effet ce dernier a conduit, pour un même titre d'acidité titrable finale, à une saveur plus acide. Cela voudrait dire qu'il ne faut pas une consommation trop poussée du citrate, ou pas d'une consommation de citrate type *Lc. lactis*. Dans le premier cas, l'association de leuconostoc aux lactocoques dans les levains ne semblerait pas pertinente, puisque le principal rôle des leuconostocs est d'utiliser le citrate. Le second cas correspondrait à ce que décrit Vedamuthu pour les beurres fermentés ; dans ces derniers, certaines associations lactocoques/leuconostocs remplissent mieux les rôles d'acidification et d'aromatisation que *Lc. lactis* seul. Il n'y a pas assez d'éléments connus pour le fromage R pour dire pourquoi il avait la saveur acide la plus basse. De même, il n'est pas possible de savoir comment obtenir une consistance de fromage proche de celle du fromage R. On peut supposer que le taux de matière grasse a un impact favorable sur l'appréciation de la consistance, et qu'il vaudrait mieux dans ce cas fabriquer à partir de lait entier. (cf. résultats II. 4 et 5).

## CONCLUSION

Ce travail permet de soulever les points suivants :

### Points méthodologiques critiques :

Les entérocoques sont fréquemment co-isolés et co-purifiés avec les lactocoques et les leuconostocs.

Pour augmenter les chances d'isoler des lactocoques, plus sensibles que les leuconostocs et les entérocoques à des conditions hostiles, il faudrait :

- ne pas trop nettoyer la mamelle avant prélèvement des échantillons de laits crus,
- réaliser ensuite les isolations à partir de laits crus ayant subi le moins de stress thermique possible, et à partir des laits fermentés en début d'acidification.

Pour simplifier la procédure d'isolement, on peut mettre l'étape d'enrichissement en milieu liquide.

Les empreintes génotypiques Rep-PCR permettent de :

- repérer les isolats insuffisamment purifiés
- identifier des sous-espèces (cas de la sous-espèce *inconnue* de *L. mesenteroides*) ou des espèces qui ne portent pas encore de nom. (cas de l'espèce *E. sp.*)
- sélectionner seulement des isolats qui ne sont pas génotypiquement apparentés
- différencier les sous-espèces génotypiques *lactis* et *cremoris* de *Lc. lactis*,
- différencier les *L. mesenteroides* des *L. pseudomesenteroides*

Seule l'identification moléculaire permet :

- d'affilier des isolats aux entérocoques.

Les caractères phénotypiques classiquement utilisés pour l'identification, type fermentaire, croissance en présence d'une concentration de 6,5 % de NaCl, et à 45 °C, et utilisation des sucres, se sont montrés insuffisants pour différencier les entérocoques de *Lc lactis*.

Le graphe montrant la variation du pH en fonction de l'acide titrable au cours de 24 h de culture en lait est un test phénotype fiable pour différencier les isolats lactocoques des isolats entérocoques

Il faut réduire au maximum le nombre de repiquage au cours du temps pour conserver les caractéristiques des isolats; en particulier les isolats *Lc. lactis* ne doivent pas perdre entre autres leur activité acidifiante dans une gamme de température allant au moins jusqu'à 42 °C.

### **Caractéristiques des isolats**

- Les isolats leuconostocs et lactocoques présentent les caractéristiques phénotypiques servant à l'identification (production de dextrans, utilisation sucres, etc ;) ou d'intérêt technologique (acidification, présence de protéase, utilisation du citrate, exigences nutritionnelles) associées à leur affiliation taxonomique.
- De plus, les isolats *Lc. lactis* présentent un profil de réponse à la température atypique, qui pourrait être dû à leur source végétale récente.
- Les 15 isolats leuconostocs représentent 4 souches de *L. mesenteroides* présentant de grandes différences de potentiel génétique.
- Les 11 isolats lactocoques représentent 4 souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* présentant de grandes différences de potentiel génétique.

### **Sélection de souches pouvant être intégrées à des levains starter entérocoques**

- des entérocoques sont fréquemment isolés de laits crus et spontanément fermentés, ce qui suggère leur participation à la fermentation des laits.
- des entérocoques résistants à 20 mg/l de vancomycine sont présents dans les laits crus. Ils subsistent dans les laits spontanément fermentés. Si cette résistance est de type transférable, ce qui reste à établir pour les isolats de la collection isolés à partir du milieu M17, ces isolats présenteraient un danger sanitaire empêchant de les utiliser comme levains.
- Les entérocoques appartenant aux espèces *E. hirae* et *E. durans* qui ont été isolés sur milieu M17 ne présentent pas un potentiel d'acidification suffisant pour pouvoir être utilisés comme seuls acidifiants.

### ***lactocoques***

- Deux souches de *Lc. lactis* de la collection, les souches de génotype 1 et 2, pourraient être utilisées comme levain acidifiant, car elles présentent un bon potentiel acidifiant et utilisent le citrate.

### ***leuconostocs***

- La souche de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* pourrait être utilisée comme levain, en association avec des *Lc. lactis*. Elle serait bien adaptée pour co-fermenter des laits de brebis et chamelle.

## **Perspectives**

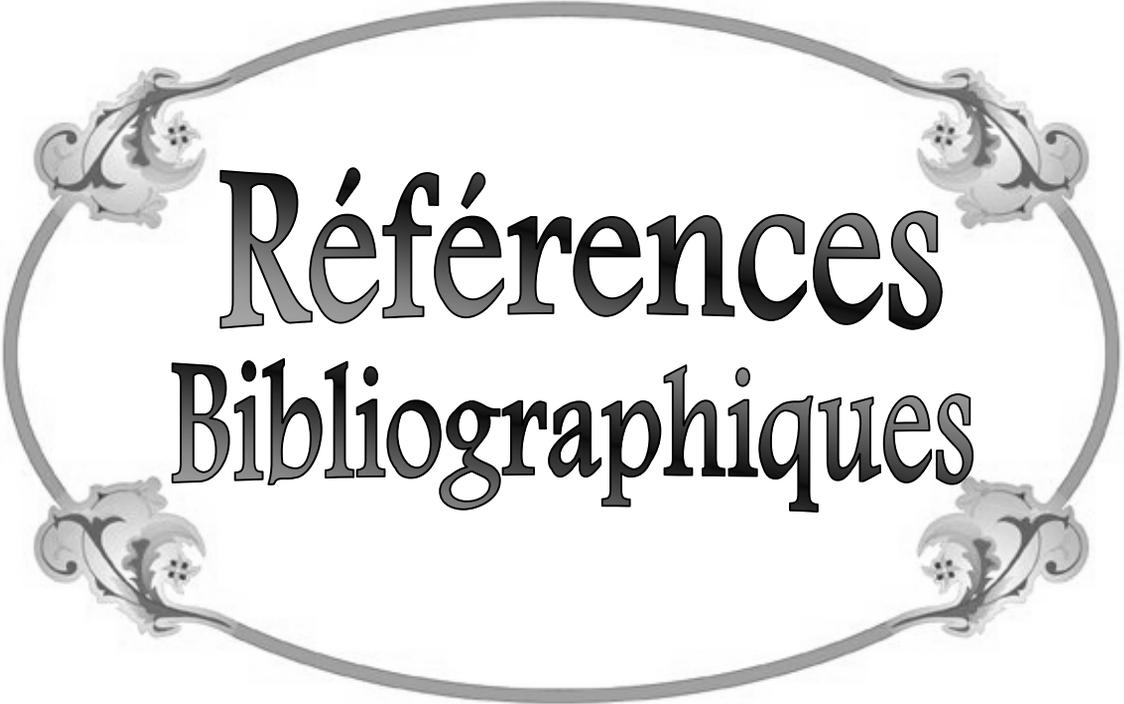
Il est nécessaire de tester en fabrication expérimentale les 2 souches de lactocoques, seules ou associées, et combinée ou non à la souche de leuconostoc. Les premiers essais de fabrication réalisés au cours de ce travail sont encourageants et permettent de servir de base pour mettre en place les essais préconisés. Des améliorations et des variantes seraient à considérer.

*Les améliorations pourraient être :*

- emploi de lait entier
- dénombrement des levains dans le laitensemencé
- suivi des nombres de levains au cours de l'acidification
- analyse physico-chimique de tous les fromages dégustés, même les fromages commerciaux
- analyse sensorielle permettant d'indiquer la hiérarchie entre les fromages pour chaque descripteur, et non pas seulement la présence de différence.

*Les variantes pourraient être :*

- emploi de lait cru
- comparaison des performances des levains selon le type de lait : lait de vache, de brebis, de chèvre, etc.
- comparaison de différents niveaux d'ensemencement



Références  
Bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Ayana, I.A.A., et Gamal El Deen, A.A.,** 2011. Improvement of the properties of goats milk *Labneh* using some aromatic and vegetable oils. *International Journal of Dairy Science* 6: 112-123.
- Abou-Donia,S.,** 2008. Origin, history and manufacturing process of Egyptian dairy products *Alexandria Journal of Food Sciences Technology* 5: 51-62.
- Abu-Tarboush, H.M.,** 1994 .Growth-behavior of 301 *Lactobacillus acidophilus* and biochemical characteristics and acceptability of acidophilus milk made from camel milk. *Milchwissenschaft* 49: 379-382.
- Aissaoui,O.,Zitoun,M.,et Zidoune,N.,** 2006. Le fromage traditionnel algérien « Bouhezza ». Séminaire d'Animation Régional. Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments .INSAT-Tunis. Tunisie 27-28-29 Novembre.
- Alais,C., et Linden, G.,** 1997. Laits et produits laitiers. Abrégé de biochimie alimentaire, pp 167-212. 4<sup>ème</sup> edit. Masson. Paris, France.
- Al Hadj, O.A., et Al Kanhal, H.A.,** 2010. Composition, technological and nutritional aspect of dromedary camel milk. *International Dairy Journal.* xxx : 1-11.
- Arias, C.A., et Murray, B.E.,** 2012. The rise of the *Enterococcus* beyond vancomycin resistance. *Nat. Microbiologie.* 16:10 : 266-278.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., De Jong, C., Wouters, J.T.M., et Smit,G. ,** 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal* 9: 725–735.
- Bachmann,H., Starrenburg, M.J., Molenaar, D.,Kleerebezem,M., et Van Hylckama V.J.E.,** 2012. Microbial domestication signature of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* 22: 115-24.
- Badis,A.,Laouarbdia Selami,N.,Guetarni,D., Kihal,M., et Ouzrout,R.,**2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partie du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *Sciences et Technologie.* 23: 30-37.
- Bauer, R., Bekker, J.P., du Toit, N.W.C., Dicks, L.M.T., et Kossmann, J.,** 2009. Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 131: 260–264.
- Beimfohr,C.,Ludwig,W.,et Schleifer, K.H.,** 1997. Rapid genotypic, differentiation of *Lactococcus* subspecies and biovar. *Journal of Systematic and Applied Microbiology* 20: 216-221.

- Beka, R.G.**, 2011. Une alternative végétale en fromagerie : Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*. Etude biochimique et application technologique. Thèse de Doctorat Ph. D en Science Alimentaire et Nutrition. Université de Lille 1.
- Ben Aissa, R.**, 1989. Le dromadaire en Algérie. Séminaire sur la digestion, la nutrition et l'alimentation du dromadaire. 2: 19-28. In Options Méditerranéennes. Série A *Séminaires Méditerranéens* Tisserand J-L(ed).
- Bencharif, A.**, 2001. Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: états des lieux et problématiques. Options Méditerranéennes Série B. *Etudes et Recherches* 32: 25-45.
- Bendimerad, N., Kihal, M., et Berthier, F.**, 2012. Isolation identification and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science and Technology* 92: 249–264.
- Benkerroum, N., et Tamime, A Y.**, 2004. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Journal of Food Microbiology* 21: 399-413.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N L., et Cogan T. M.**, 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259–274.
- Bergey's Manual.**, 2009. Systematic Bacteriology. Second edition. 3: 625.
- Berthier, F., et Ehrlich, S.D.**, 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16 S/23S rRNA spacer regions. *FEMS Microbiology Letters* 161: 97–106.
- Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., et Grappin, R.**, 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal* 11: 293–305.
- Biavasco, F., Foglia, G., Paoletti, C., Zandri, G., Magi ,G., Guaglianone, E., Sundsfjord , A.,Pruzzo , C., Donelli , G., et Facinelli, B.**, 2007. Van-A type enterococci from human, animal and food: specie sdistribution, population structure Tn 1546 typing and location, and virulence determination. *Journal of Applied and Environmental Microbiology.*73: 3307-3319.
- Boubekri, K ., et Ohta, Y.**,1996. Antimutagenicity of lactic acid bacteria from *El-Klila* cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 397-402.
- Bourdier, J F., et Luquet, F. M.**, 1981. Dictionnaire Laitier. 2<sup>ème</sup> éd. augmentée. Paris.
- Bourdon,N.,Fines-Guyon,M.,Thiolet,J.M.,Maugat ,S.,Coignad,B.,Leclercq,R.,et Cattoir,V.**, 2011. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 66: 713-721.
- Bourel,G.,Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., et Garmyn, D.**, 2001. Métabolisme sucre –citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Physiologie, métabolisme. *Lait.* 81:75-82.

**Bourgeois, C. M., et Larpent, J.P.,1996.** Les bactéries lactiques et leurs propriétés antimicrobiennes .Aliments fermentés et fermentation alimentaire. Microbiologie alimentaire. 2: 4-39 et 431-447. Tec et Doc Lavoisier.

**Bouton, Y., Buchin, S., Duboz, G., Pochet, S., et Beuvier, E., 2009.** Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Journal of Food Microbiology* 26: 183–191.

**Bruinenberg, P., Vos, P., et de Vos, W., 1992.** Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strain : regulation and effect on growth and acidification in milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 58: 78-84.

**Brulé, G., Lenoir, J., et Remeuf, F.,1997.** La micelle de caséine et la coagulation du lait, in : Eck, A., et Gillis, J.C. Le fromage pp 7-41. Tec et Doc Lavoisier, France.

**Cabral, M.E., Abeijon Mukdsi, M C., Medina de Figueroa, R B., et Gonzalez, S N., 2007.** Citrate metabolism by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from goat's and ewe's milk: influence of glucose and lactose. *International Journal of Microbiology* 53: 607–615.

**Chazarra,S.,Sidrach,L.,Lopez-Molina,D.,et Rodriguez-Lopez, J.N., 2007.** Characterization of the milk –clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L) flowers. *International Dairy Journal* 17: 1393-1400.

**Chilliard, Y., 1997.** Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre : comparaison avec les laits de vache et humain. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. Annales Pharmaceutiques Françaises 59: 1-51.

**Cibik, R., Lepage, E., et Tailliez, P., 2000.** Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconosotoc citreum* from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragement amplification. *Journal of Systematic and Applied Microbiology* 23: 267-278.

**Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, M., Novak, L., Lindley, N.D.,et Loubière,P.,1995.** Rational development of a simple synthetic medium for the substained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology* 79:108-116.

**Condon,S., 1987.** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters* 46: 269-280.

**Curtin, A. C., et McSweeney, P.L.H., 2004.** Cheese: catabolism of amino acids in cheese during ripening. In *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* 1: 435-454. Elsevier.

- Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M.C., et Janssen D.,** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. in De Roissard H et Luquet,F (eds). Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques,1: 25-116. Lorica.Uriage.
- Delves-Broughton, J.,** 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 57(12) : 525-527.
- Devoyod, J.J., et Poullain, F.,** 1988. Les leuconostocs. Propriétés. Leurs rôles en technologie laitière. *Le Lait* 68: 249-280. I N R A. Jouy en Josas.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van Landuyt, H.W., Gordts, B., Butaye,P., Swings, J., et Haesebrouck, F.,** 2002. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology* 92: 821-827.
- De Vuyst , L., Schrijvers ,V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., et Messens, W.,** 2002 .The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 68: 6059-6069.
- De Vuyst, L., Vaningelgem, F.,Ghijssels, V., Tsakalidou, E., et Leroy, F.,** 2011. New insights into the citrate metabolism of *Enterococcus faecium* FAIRE- E 198 and its possible impact on the production of fermented dairy products. *International Dairy Journal* 21: 580-585.
- Dols, M., Chraibi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N D., et Monsan, P F.,** 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 63: 2159.
- Drici, H., Gilbert, C., Kihal, M., et Atlan, D.,** 2010. Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *International journal of Applied Microbiology* 108: 647-657.
- Dunham et Schoenlein.,** 1926. Manuel de milieux de culture in Admin, M., Milieux de culture. Microbiologie Alimentaire. <http://microbioalimentaire.dynamicforum.net/t2-b>.
- Dyas, A., et Chauhan, N.,** 1988. Vancomycin- resistant leuconostocs. *Lancet*. 331- 306.
- Eck, A.,** 1997 .Le fromage : de la science à l'assurance qualité. Catalogue Méditerranéen Agri du Centre de Documentation Méditerranéen. Tec et Doc Lavoisier. Paris.
- Eck, A., et Gillis, J.C.,** 1997. Les agents de transformation du lait. *Le fromage*. 3<sup>ème</sup> éd, pp 6-189. Tec et Doc Lavoisier.Paris.
- El-Agamy, El.,** 2006. Camel milk. In: Park YW et Haenlein GF (Eds),. Handbook of milk of non-bovine mammals. pp 297-344. Blackwell Publishing, Iowa, USA.

**El Marrakchi, A., et Hamama, A.,** 1995. Aspects hygiéniques du fromage frais de chèvre. Perspectives d'amélioration de la qualité. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II Département d'Hygiène et Industries des Denrée Alimentaire d'Origine Animale.

**Euzéby, J.P.,** 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology* 7: 590-592.

**FAO/OMS.,** 1990 (1978 modifié) Codex alimentarius n° A-6. Chapitre 6 : Fromage : Définition et Classification.

**FAO/OMS.,** 1996. Codex alimentarius. n°A-6. Code de principes concernant le lait et les produits laitiers. Normes internationales individuelles pour les fromages.

**FAO.,** 2002. Le lait dans la nutrition humaine. Département économique et sociale. [www.FAO.org](http://www.FAO.org).

**FAO.,** 2006. Le lait de chamelle à la vente en groupe. Communiqué de presse FAO. <http://www.fao.org>.

**Farrow, J.A.E., Facklam, R. R., et Collins, M.D.,** 1989. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 39: 279-283.

**Fernandez, E., Alegria, A., Delgado, S., Cruz Martín, M., et Mayo B.,** 2011. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp *cremoris*. genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 77: 5324–5335.

**F.I.L.,** 2011. Variation géographique de la production de lait en 2010. Communication de la FIL-IDF. Situation mondiale de l'industrie laitière. Canada 22-23 mars.

**Fisher, K., et Phillips, C.,** 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155: 1749-1757.

**Foulquie -Moreno, MR., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., et De Vuyst., L.,** 2006 .The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1-24.

**Fox, P F., Guinee, T.P., Cogan,T.M., et McSweeney, P.L.H.,** 2000. Starter cultures ,Chapter 5.in Fundamentals of cheese science. A Wolters Kluwer Company. 99-053386. [www.aspenpublishers.com](http://www.aspenpublishers.com)

**Fox, P.F., et Mc Sweeney,P.L.H.,** 2004. Cheese an overview. In *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, general aspects, third edition. 1: 1-8.

- Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, KH., et Obst, U.,** 1998. Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Journal of Systematic and Applied Microbiology* 21: 450-453..
- Frankenberg, L., Brugna, M., et Lars Hederstedt, L.,** 2002. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *Journal of Bacteriology* 184: 6351-6356.
- Galan, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., Fernandez-Salguero, J.,** 2008. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal* 18: 93-98.
- Ganesan, B., Stuart, M.R., et Weimer, B.C.,** 2007. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 73:2498–2512.
- Garvie, E.I.,** 1960. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *Journal of Dairy Research* 27: 283-292.
- Garvie, E.I.,** 1967. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of Gen. Microbiology* 48: 439-447.
- Garvie, E.I.,** 1986. Genus *Leuconostoc*, In: Sneath P, Mair J, Sharpe M, Holt J, (eds) *Bergey's Manual on Systematic Bacteriology* 2: 1071-1075, Baltimore, USA.
- Gaya, P., Babin, M., Medina, M., et Nunez, M.,** 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology* 87: 849–855.
- Gevers, D., Huys, G., et Swings, J.,** 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31–36.
- Ghera, L.,** 2007. Contribution à la connaissance des systèmes d'élevage bovin. Thèse en Agronomie. Option : Production animale. Université Farhat Abbas. Sétif, Algérie.
- Grazia Fortina, M., Ricci, G., Morra, D., et Manachini, P.L.,** 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus*. sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1717-1721.
- Gu, C.T., Wang, F., Li, C.Y., Liu, F., et Huo, G.C.,** 2010. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 : 1548-1551.
- Guizani, N., Kasapis, S., et Al Ruzeiki, M.,** 2001. Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk). *International Journal of Food Science and Technology* 36: 199-205.
- Haenlein, G.F.W.,** 2004. Goat milk in human nutrition. in *Small Ruminant Research*. 51: 155-163 Published by Elsevier Science B.V..

- Haenlein, G.F.W., et Wendorff, W.L.**, 2006. Sheep milk. in Handbook of milk of non-bovine mammals. pp137-194, eds Park et Haenlein. Blackwell Publishing Professional
- Hamama, A., Zahar, M., Mahfoud, Y., et Loudivi, M.**, 2003. Essais industriels de fabrication du fromage frais marocain "Jben" à partir du lait recombiné. Proceeding of the joint EAAP-CHEAM-FAO Symposium on Prospects for a Sustainable Dairy Sector in the Mediterranean, Hammamet, Tunisia. 26 et 28 Novembre 2000. Eds Djemali M et Guellouz M. N°99, pp 209-215.
- Helinck, S., Richard, M., et Juillard, V.**, 1997. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* depend on the type of the enzyme. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 63: 2124-2130.
- Hemme, D., et Foucaud-Scheunemann, C.**, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14:467-494.
- Hodowitz, H.W., Handwerker, S., Van Horn, K.G., et Wornser, G.P.**, 1987. *Leuconostoc*, an emerging vancomycin resistant pathogen. *Lancet* 330: 1329-1330.
- Hoefnagel, M.H.N., Starrenbourg, M.J.C., Martens, D.E., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., VanSwam, I.I., Bongers, R., Westerhoff, H.V., et Snoep, J.L.**, 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modeling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology*, 148:1003-1013.
- Hugenholtz, J.**, 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Review* 12:165-178.
- Hugenholtz, J., et Starrenburg, M.J.C.**, 1992. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Leuconostoc* sp. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 38:17-22.
- Jaubert, G.**, 1997. Biochemical characteristics and quality of goat milk. CHEAM. Option Méditerranéennes. 25: 71-74.
- Kaci, M., et Sassi, Y.**, 2007. Industrie laitière et des corps gras. Rapport pour l'Agence nationale de développement de la PME. Recueil des fiches sous sectorielles. EDP édit.
- Keenan, T.W., Lindsay R.C., et Day, E.A.**, 1966. Acetaldehyde utilisation by *leuconostoc*. *Journal of Applied Microbiology* 14: 802-806.
- Kempler, G.M., et McKay, L.L.**, 1979. Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 37: 316-323.
- Kempler, G.M., et McKay, L. L.**, 1980. Improved medium for detection of citrate - fermenting *Streptococcus lactis* subps *diacetylactis*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 39: 926-927.

**Khaldi,R.,Haddad,M., et Padilla,M.,** 2006. Attentes et attitudes des consommateurs urbains face aux produits laitiers : cas de la commune de Tunis. *Options Méditerranéennes : Série A, Séminaires Méditerranéens*, 78: 365-375.

**Konuspayeva,G.,Faye, B., et Loiseau, G.,** 2009. The composition of camel milk : a meta – analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22 : 95-101.

**Koussou, M.,Duteurtre,G.,et Mopota, L.,** 2007. Consommation de lait dans les bars laitiers de la ville de N'Djamena au Tchad. *Elev Med. Vet. Pays Trop.*60: 39-44.

**Lahsaoui,S.,** 2009. Etude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien (Kilila). Thèse. Département d'Agronomie. Université de Batna. Algérie.

**Laverde Gomez, J A., Hendrickx, AP., Willems, RJ., Top, J., Sava, I., Huebner ,J., Witte ,W., et Werner, G.,** 2011. Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Plos One*. 29. 6: 16-20.

**Lee, H.J., Park, S.Y., et Kim, J.,** 2000. Multiplex PCR-based detection and identification of leuconostoc species. *FEMS Microbiology Letters* 193: 43-247.

**Lee, S.H., Park, M.S., Jung, J.Y., et Jeon, CO.,** 2012. *Leuconostoc miyukkimchii sp nov.*, isolated from brown algae (*Undaria pinnatifida*) kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1098-1103.

**Lhoste, F.,** 2003. Lait de chamelle pour l'Afrique. Atelier sur la filière laitière caméline en Afrique. Niamey.FAO Production et santé animale.

**Lopez-Aliaga, I., Diaz-Castro,J., Alférez, M.J.M.,Barrionuevo, M., et Campos, M.S.,** 2010. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Sciences and Technology* 90: 611-622.

**Lopez de Felipe, F., et Hugenholt, J.,** 1999. Pyruvate flux distribution in NADH-oxidase-overproducing *Lactococcus lactis* strains as a function of culture conditions. *FEMS Microbiology Letters* 179:461-466.

**Lopez de Felipe, F., Starenbourg, M.J.C., et Hugenholt, J.,**1997. The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis* susp *lactis*.MG1363. *FEMS Microbiology Letters* 156:15-19.

**Ludwig, W.,Schleifer, K.H.,et Whitman,W.B.,** 2009. Order II Lactobacillales, revised road map to the phylum *Firmicutes*. ord. nov. In: Devos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., and Whitman, W.B (eds) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, volume 3 (The Firmicutes), p 484. Springer Dordrecht, Heidelberg, Germany.

**Luquet,F.M., Keilling, J.,et de Wilde,R.,** 1985. Lait et produits laitiers : vache, brebis et chèvre. Les laits de la mamelle à la laiterie. Lavoisier. France

- Mathot,AG.,Kihal,M.,Prevost, H., et Divies, C.,** 1994 Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *International Dairy Journal* 4 : 459-469.
- Mayeux,J.,Sandine, W., et Elliker.P.,** 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc organism* in mixed strain cultures. *Journal Dairy Sciences* 45: 655-656.
- McSweeney,P.L.H.,et Fox,P.F.,** 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate, general aspect. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H Cogan, T.M. and Guinee, T.P . *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1, 3ème édition pp 361-372 .Elsevier London, England.
- Medouni,Y.,Boulahchiche,N,et Brahimi,R.,** 2005. Rôle de la femme rurale dans le système de production agropastorale. Cas de la fraction Ouled Baida de la zone d'El Guedid Région de Djelfa (steppe centrale). Option : *Méditerranéennes*, Série A , n° 70.
- Mehaia, M.A., Hablas, M.A., Abdel-Rahman, M., El-Mougy,K and Samy,A .,**1995. Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Journal of Food Chemistry* 52:115-122.
- Mehaia,M.A., et El-Khadragy, S.M.,** 1999. Compositional characteristics and sensory evaluation of *Labneh* made from goat's milk. *Milchwissenschaft* 54: 567-569.
- Mehaia,M.A.,** 2005. Manufacture of Fresh Labenh from goats' milk uing ultrafiltration process. *Journal of Food Technology* 3: 24-29.
- Mekentichi.,** 2003. Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (Bouhezza).Thèse. Dépt. Agronomie. Université de Batna, Algérie.
- Michel, V.,** 2011. Le réservoir trayon : sa composition et les pratiques influentes. Dans microflore du lait cru vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. Filière fromagères valorisant leur terroir. pp 79-84. France. Site web : [idele.fr/?eID=cmis\\_download&old=worckspace://...5441...](http://idele.fr/?eID=cmis_download&old=worckspace://...5441...)
- Michel, M., et Gutmann, L.,** 1987. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. Therapeutic realities and possibilities. *Lancet*.349:1901-1906.
- Mietton, B., Gaucheron, F., et Salaün Michel, F.,** 2004. In Minéraux et produits laitiers, pp 471-559.Tec & Doc.
- Morandi, S., Brasca , M., et Lodi, R.,** 2011. Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Sciences and Technology* 91:341–359.
- Morandi, S., Cremonesi ,P., Povoło ,M., et Brasca.M.,** 2012. *Enterococcus lactis* sp. nov. from Italian raw milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62(8): 1992-1996. Doi. 10.1099/ijss/0030825-0

- Morgan, F., Bodin, J.P., et Gaborit, P.,** 2001. Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait* 81: 743-756.
- Nieto-Arribas, P., Sesena, S., Poveda, J.M., Palop, L., et Cabezas, L.,** 2010. Genotypic and technology characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheeses manufacture. *Journal of Food Microbiology* 27: 85-93.
- Nomura, M., Kobayashi, M., et Okamoto, T.,** 2002. Rapid PCR based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 68: 2209-2213.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., et Okamoto, T.,** 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 101: 396-405.
- Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M.M., et Dadie, A.,** 2009. Characterization of the purified coaguland extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *International Journal of Food Technology* 7: 20-29.
- Ogier, J.C., Casalta, E., Farrokh, C., et Saihi, A.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126: 286-290.
- Ogier, J.C., et Serror, P.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126: 291-301.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., et Amar, M.,** 2009. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'lben'. *Journal of Applied Microbiology* 106: 486-495.
- Park, Y.W.,** 2006. Goat milk-chemistry and nutrition, in Park et Haenlein (eds) Handbook of milk of non-bovine mammals, pp: 34-58, Blackwell Publishing Professional, USA.
- Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., et Haenlein, G.F.W.,** 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milks. *Small Ruminant Research* 68: 88-113.
- Park, Y.W., Zhang, H., Zhang, B., et Zhang, L.,** 2006. Mare milk, in Park et Haenlein (eds), Handbook of milk of non-bovine mammals, pp. 275-296. Blackwell Publishing Professional, USA.
- Perez, T., Balcazar, J.L., Peix, A., Valverde, A., Velazquez, E., de Blas, I., et Ruiz-Zarzuelan, I.,** 2011. *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. *nov.* isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1894-1898.
- Rademaker, J.L.W., Herbet, H., Starrenburg, M.J.C., Naser, S.M., Gevers, D., Kelly, W.J.,**

- Hugenholtz, J., Swings, J., et van Hylckama Vlieg, J.E.T .,** 2007. Diversity analysis of dairy and non dairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG) 5-PCR fingerprinting. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 73: 7128–7137.
- Rahal,K.,** 2004. Situation du cheval en Algérie .Thèse de doctorat .Université de Blida, Algérie.
- Ramet, J.P.,** 1985. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. La matière première. *Lait*
- Rasouli Pirouzian, H., Hesari, J., Farajnia, S., Moghadamm, M., et Ghiassifar, S.,** 2012. Effect of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional Lighvan cheese on physicochemical and sensory characteristics of Iranian UF white cheese. *Journal of Agricultural Sciences and Technology* 14(5) : 1023-1034.
- Raynaud,S.,** 2006. Régulation métabolique et transcriptionnelle de l’autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Doctorat spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Filière Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Université Paul Sabatier. Toulouse, France.
- Rea,M.C.,Franz,C.M.A.P.,Holzapfel,W.H, et Cogan,T.M.,**2004. Development of enterococci and production of tyramine during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Research* 43: 247–258.
- Rey,A.,** 1994. Dictionnaire historique de la langue française : Le Robert Tome I: p 848. Nouvelle éd. Paris, France.
- Samet-Bali, O., Bellilan, A., Ayadi, M.A., Marzouk, B., et Attia, H.,** 2010. A comparison of the physicochemical, microbiological and aromatic composition of traditional and industrial *Leben* in Tunisia. *International Journal of Dairy Technology* 63: 98–104.
- Sandine, W.E., Elliker, P.R., et Hays, H.,** 1962. Cultural studies on *Streptococcus diacetylactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Canadian Journal of Microbiology* 8:161-174.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., et Tsakalidou, E.,** 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621–647.
- Schillinger, U ., et Lüke, F.K.,** 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology* 4:199-208.
- Schulz-Collins, D., Arrabawn, Co-op,N., Co,Tipperary ,Ireland., et Senge, B.,** 2004. Acid –and acid/rennet-curd cheeses Part A: Quark, Cream Cheese and Related Varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Major Cheese Groups..* Third édition, Vol 2. .

- Siezen, R.J., Starrenbourg, M.J.C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D et Van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2007.** Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* plant isolates identifies adaptation mechanisms to the plant niche. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 74: 424-436.
- Svec, P., et Sedláček, I., 2008.** Characterisation of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from surface water. *Folia Microbiology (Praha)* 53:5 3-6.
- Tachon, S., Bernhard Brandsma, J., et Yvon, M., 2009.** NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 76: 1311.
- Tamine, A.Y., Wszolek, M., Božanic, R.,et Özer, B., 2011.** Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research* 101: 2-16.Elsevier
- Tanous, C., Chambellon, E., Le Bars, D., Delespaul, G., et Yvon, M., 2006.** Glutamate deshydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 72: 1402-1409.
- Tantaoui El Araki , A.,1983.** Etude sur le *Lben* marocain. *Le Lait* 63: 230-245.
- Tantaoui El Araki, A., et El Marrakchi, A., 1987.** Study of Moroccan dairy products *Lben* and smen. *Journal of Applied Microbiology* 3: 211-220.
- Terzaghi, B.E., et Sandine, W E., 1975.** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology* 29: 807-813.
- Teuber, M., Geis, A., et Neve, H., 1995.** The genus *Lactococcus*. In Balows A, Truber HG, Dworkin, Harder MW et Schleifer KH(eds). *The Prokaryotes* . Vol II. 2nd. 1482- 1501 Springer- Verlag, New York, USA.
- Teuber, M., et Geis, A., 2006.** The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. *Prokaryotes*. 4: 205-228.
- Thomas, T., 1973.** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. *New Zealand Journal of Dairy Science* 8: 70-71.
- Thomas,L.,et Dubeuf,J.P., 1995.** Les perspectives de développement de la filière lait de chèvre dans le bassin méditerranéen. Une réflexion collective appliquée au cas marocain. Journée professionnelles des 5, 6 et 7 octobre organisée au Maroc par le ministère de l'agriculture et de la mise en valeur agricole avec le concours de la FAO et du CIRVAL. Etude FAO production et santé animales.
- Upadhyay,V.K., McSweeney, P.L.H.,Magboul,A.A.A., et Fox, P.F.,2004.** Proteolysis in cheese during ripening. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. and Guinee, T.P.(eds), *General Aspects.Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1, 3ème édition pp 391-434. Elsevier, London, England.

**Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F., et Devriese, L. H., 2001.** *Enterococcus villorum* sp.nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:393-400.

**Vedamuthu, E. R., 1994.** The dairy *Leuconostoc* - Use in dairy-products. *Journal of Dairy Sciences* 77: 2725-2737.

**Versalovic, J., Bruijn, F. J. D. E., et Lupski, J. R., 1991.** Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. pp 437-447. In Bruijn, F. J. D. E., Lupski, J. R. et Weinstock, G. *Bacterial Genome, physical structure and analysis.* Springer.

**Yahiaoui, S., 2008.** Elevages équins. Les équidés d'Algérie. Institut technique des élevages ITEL 17: 26. [www.algeria.com/forums/.../26646-l-élevage-équin-en-algérie](http://www.algeria.com/forums/.../26646-l-élevage-équin-en-algérie).

<http://www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F04.htm>

(<http://www.produits-laitiers.com/economie-et-societe/filiere/monde/>

<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/dairy/camel.html>).

(<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Algeria/Algerie.htm>).

(<http://www.tamanrasset.net/modules/news/article.php?storyid=1232>).

(<http://www.el-annabi.com/economie/1782-l-experience-francaise-pour.html>),

<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Algeria/Algerie.htm>),

(<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/PDF%20files/Algeria-French.pdf>).

<http://www.pleinchamp.com/elevage/ovins-caprins/actualites/etranger-en-algerie-100-000-familles-vivent-de-l-elevage-ovin>)

<http://www.nouara-algerie.com/article-les-races-caprines-en-algerie-le-poids-de-la-tradition-44853066.html>

<http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f04.htm>

[wikipedia.org/wiki/Lait\\_de\\_vache](http://wikipedia.org/wiki/Lait_de_vache)

<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>

<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>

[www.algeria.com/forums/.../26646-l-élevage-équin-en-algérie](http://www.algeria.com/forums/.../26646-l-élevage-équin-en-algérie)

<http://www.euroserum.com/fr/notre-lactoserum/10/le-lactoserum.htm>



# Annexes

## ANNEXES I

**GRAPHES REPRESENTANT LA PRODUCTION D'ACIDE ET LA VARIATION DU pH EN FONCTION DU TEMPS CHEZ LES ISOLATS DE : Lactococcus, Leuconostoc et Enterococcus.**

### I-Variation du pH en fonction de l'acide

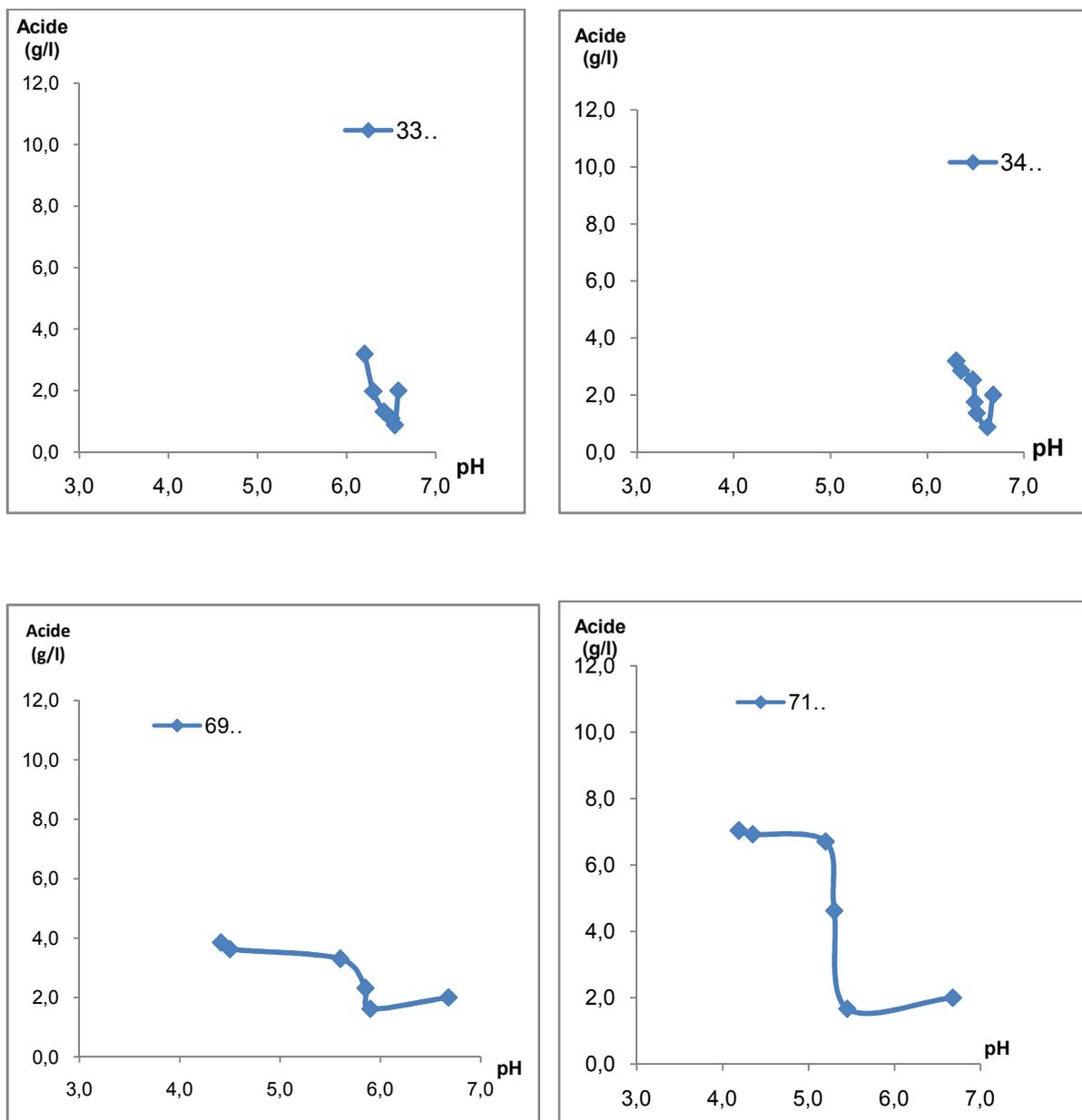


Figure 1 : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Enterococcus hirae* 1

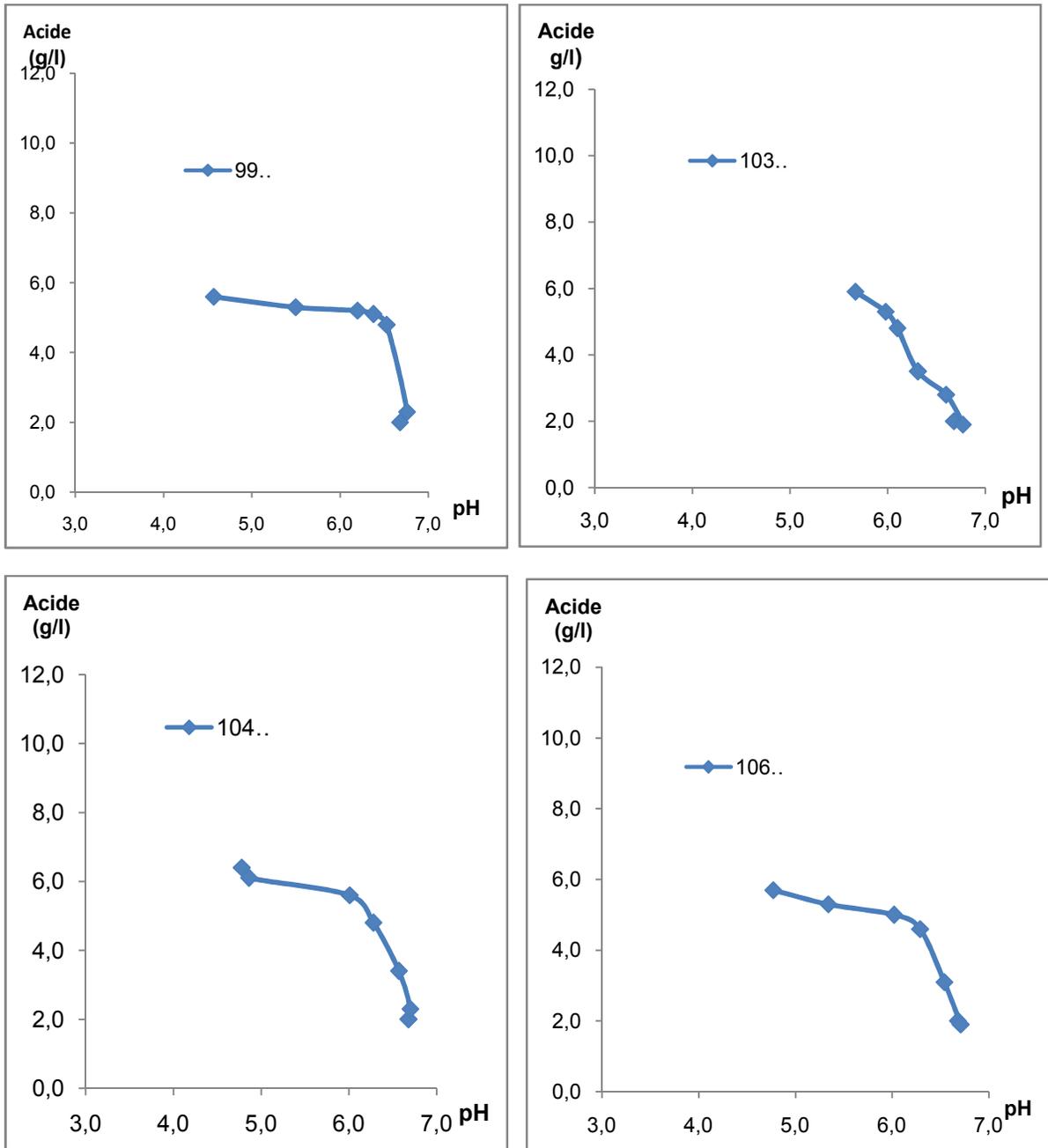


Figure 2 : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Enterococcus hirae* 1(suite)

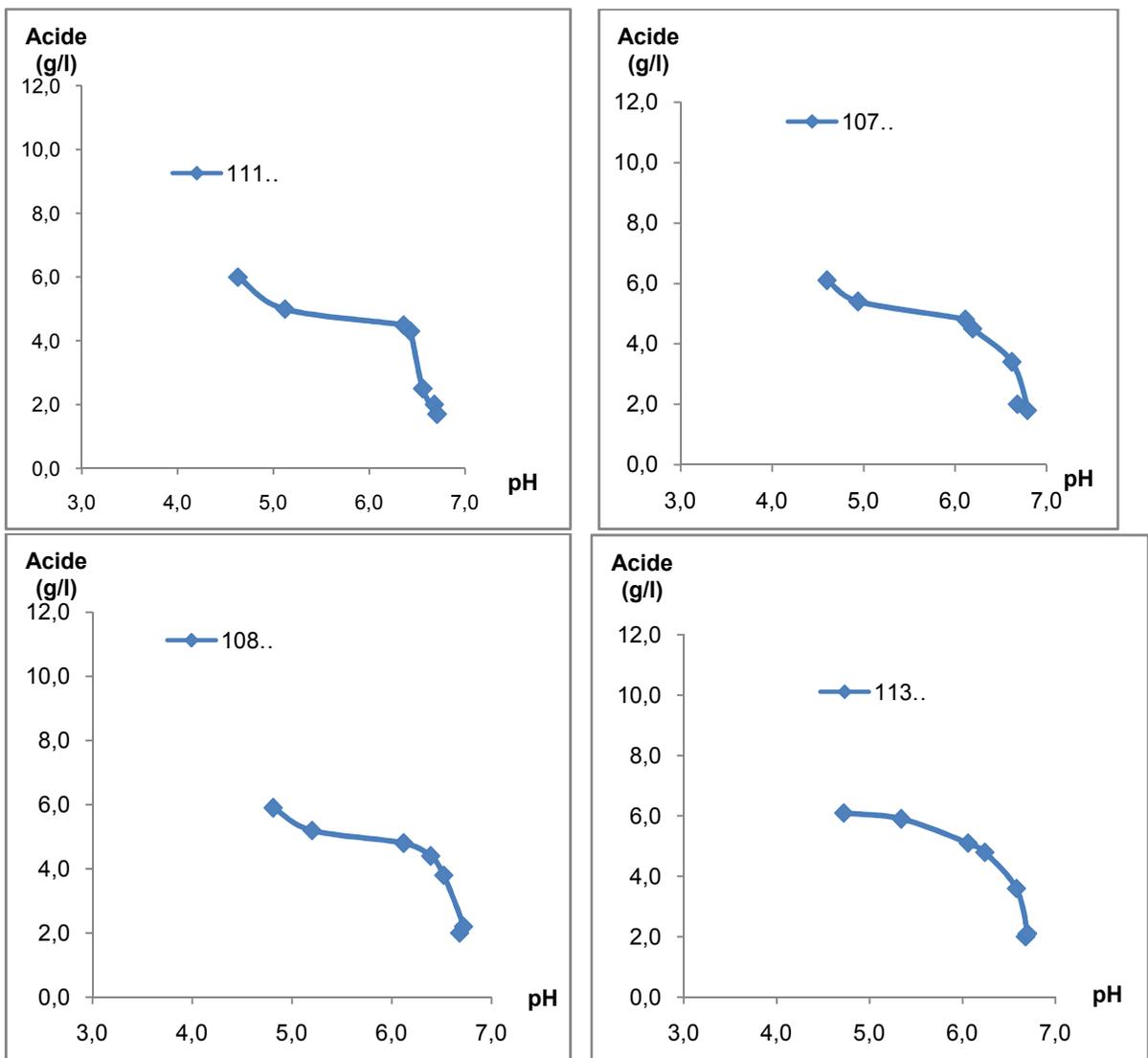


Figure 3 : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Enterococcus hirae* 1(suite)

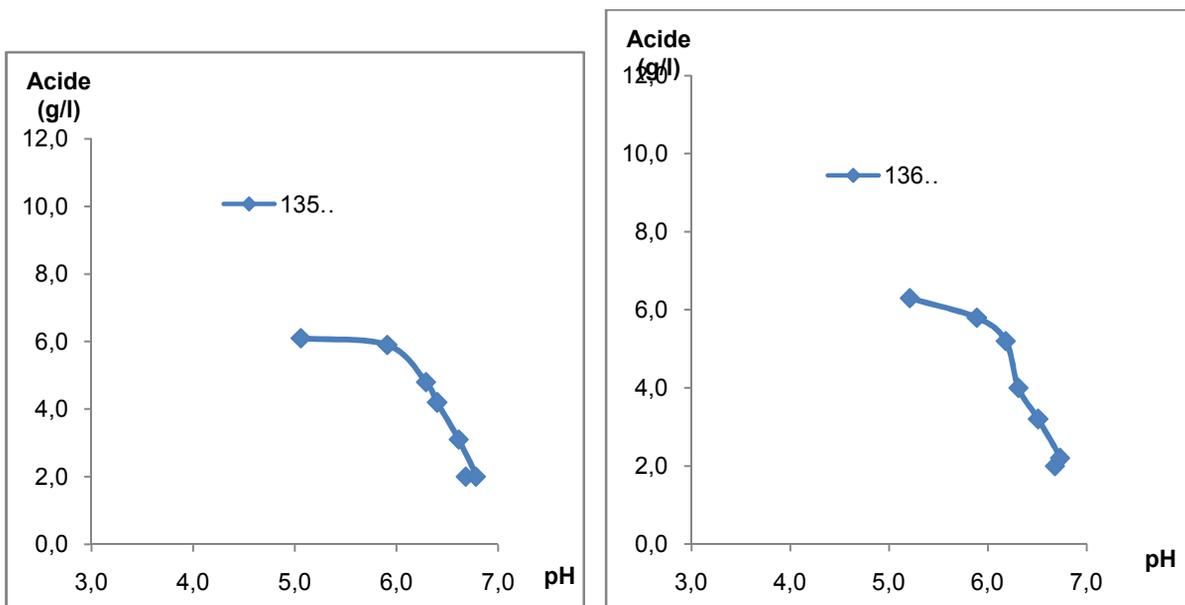


Figure 4 : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Enterococcus hirae* 1(suite)

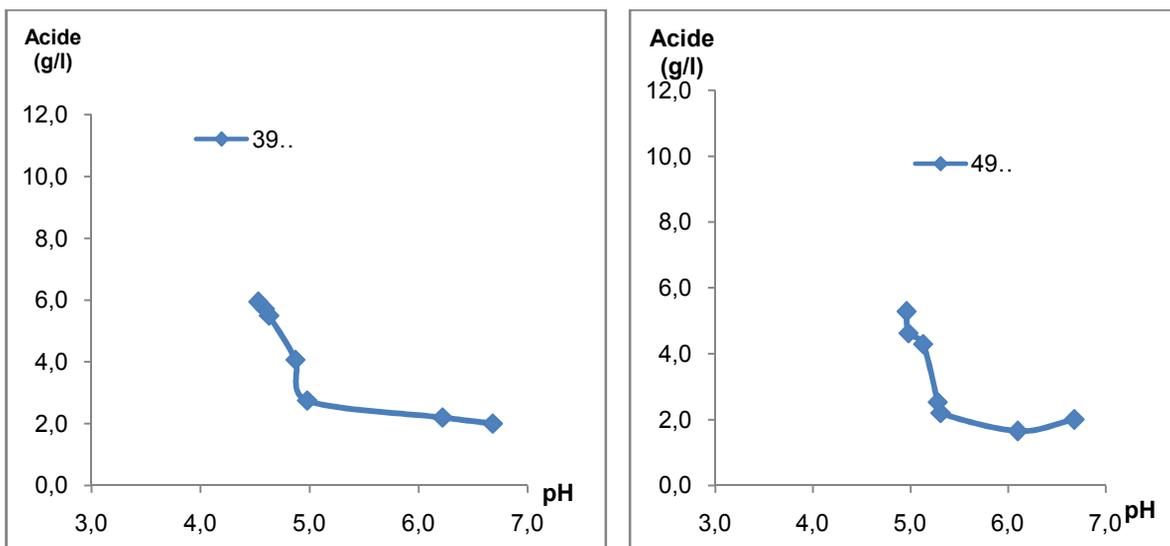


Figure 5: Variation du pH en fonction d'acide produit par *Enterococcus hirae* 2

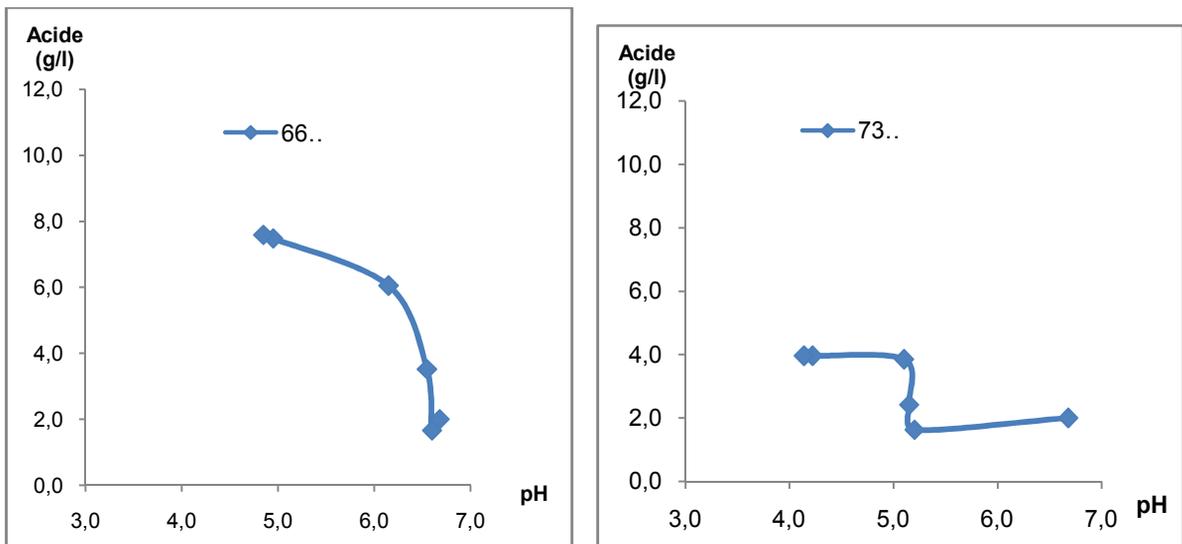


Figure 6: Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus hirae 2* (suite)

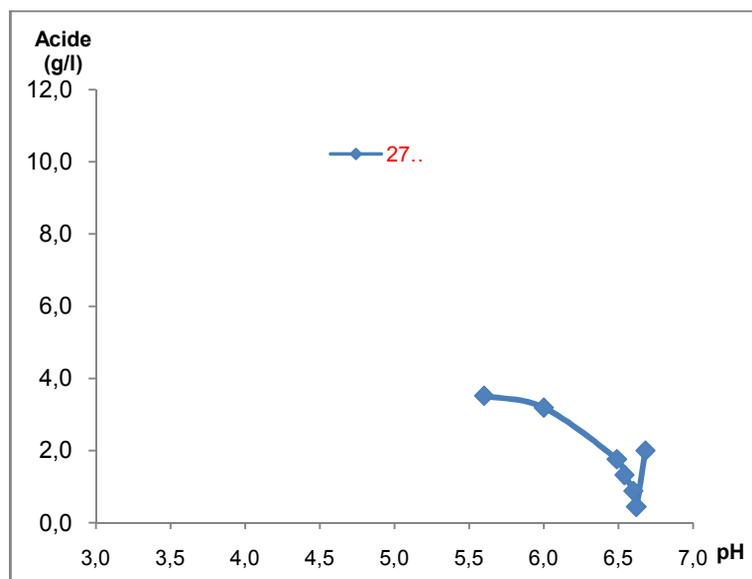


Figure 7 : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus sp*

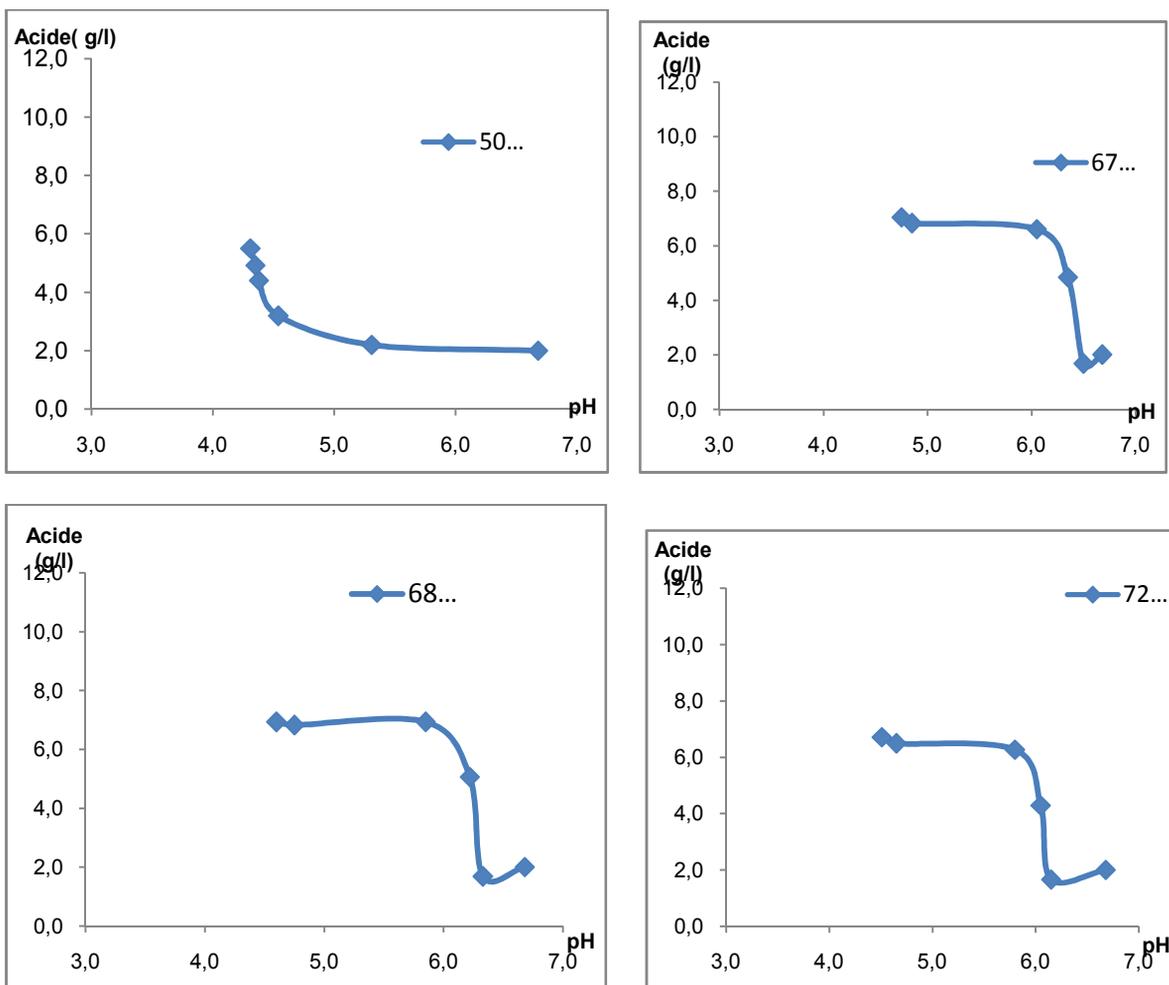


Figure 8 : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus faecalis*

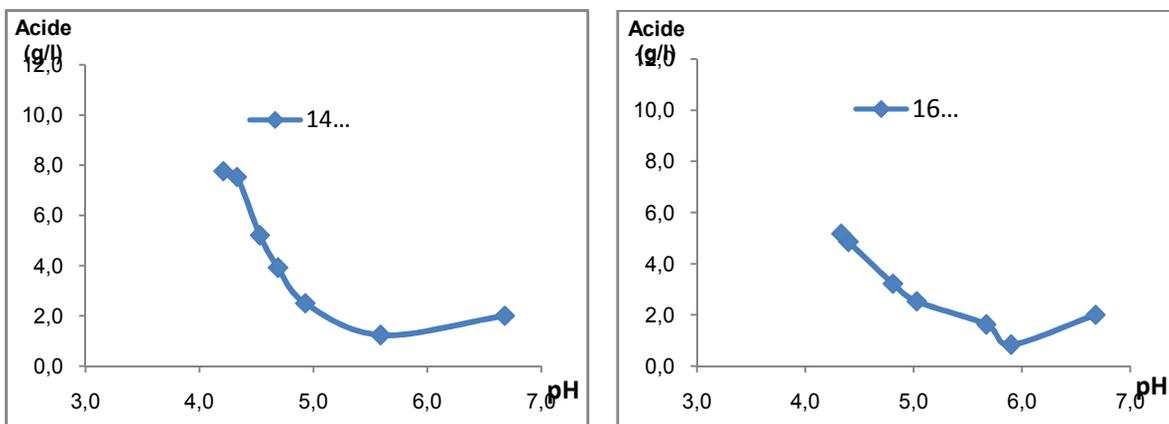


Figure 9: Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus durans 1*

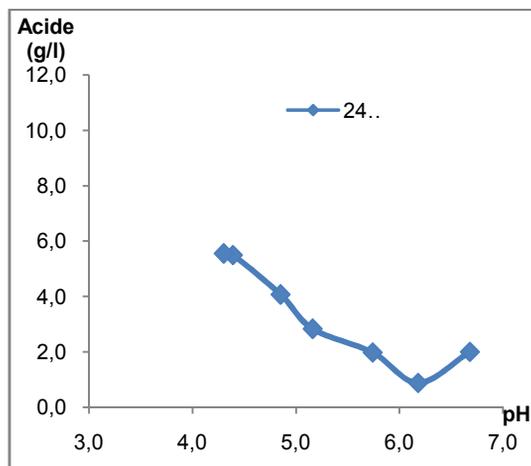
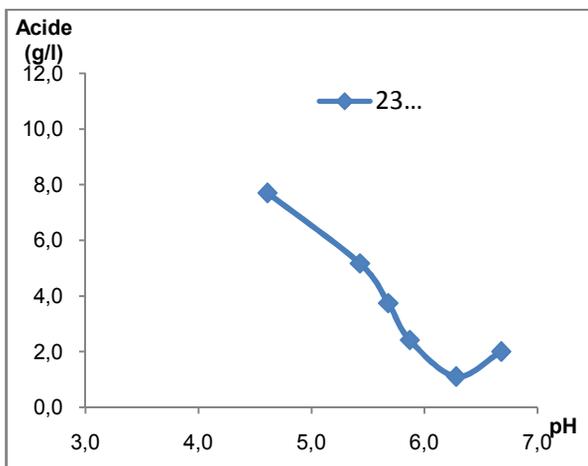
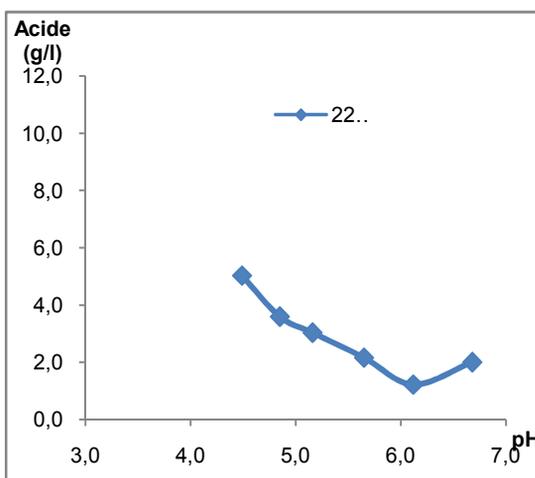
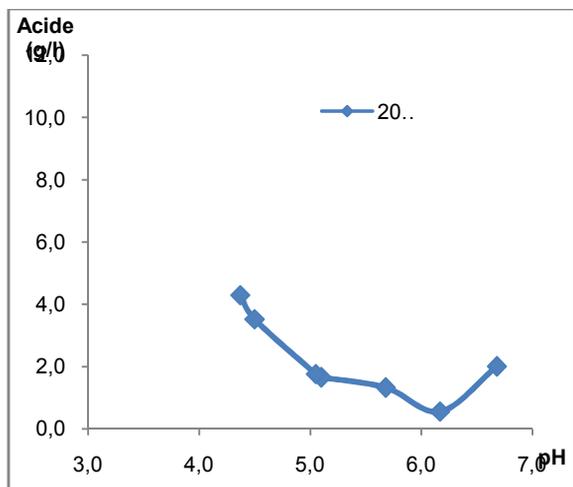
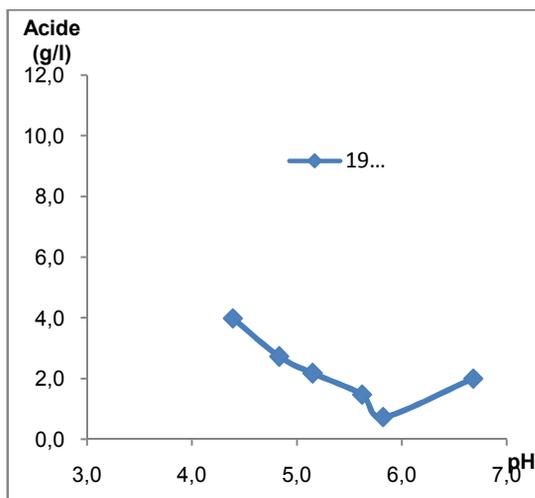
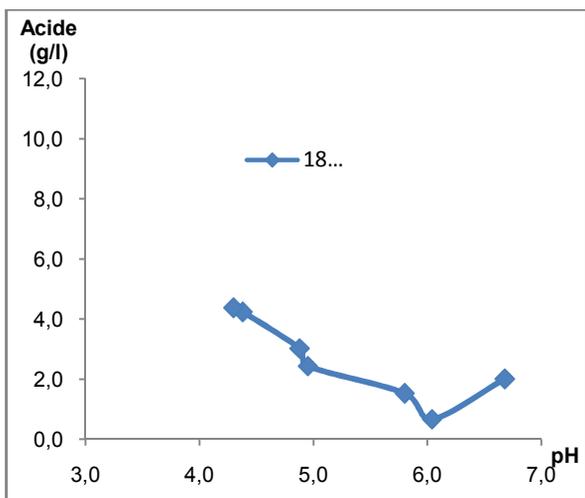


Figure 9 (suite): Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus durans*  
1

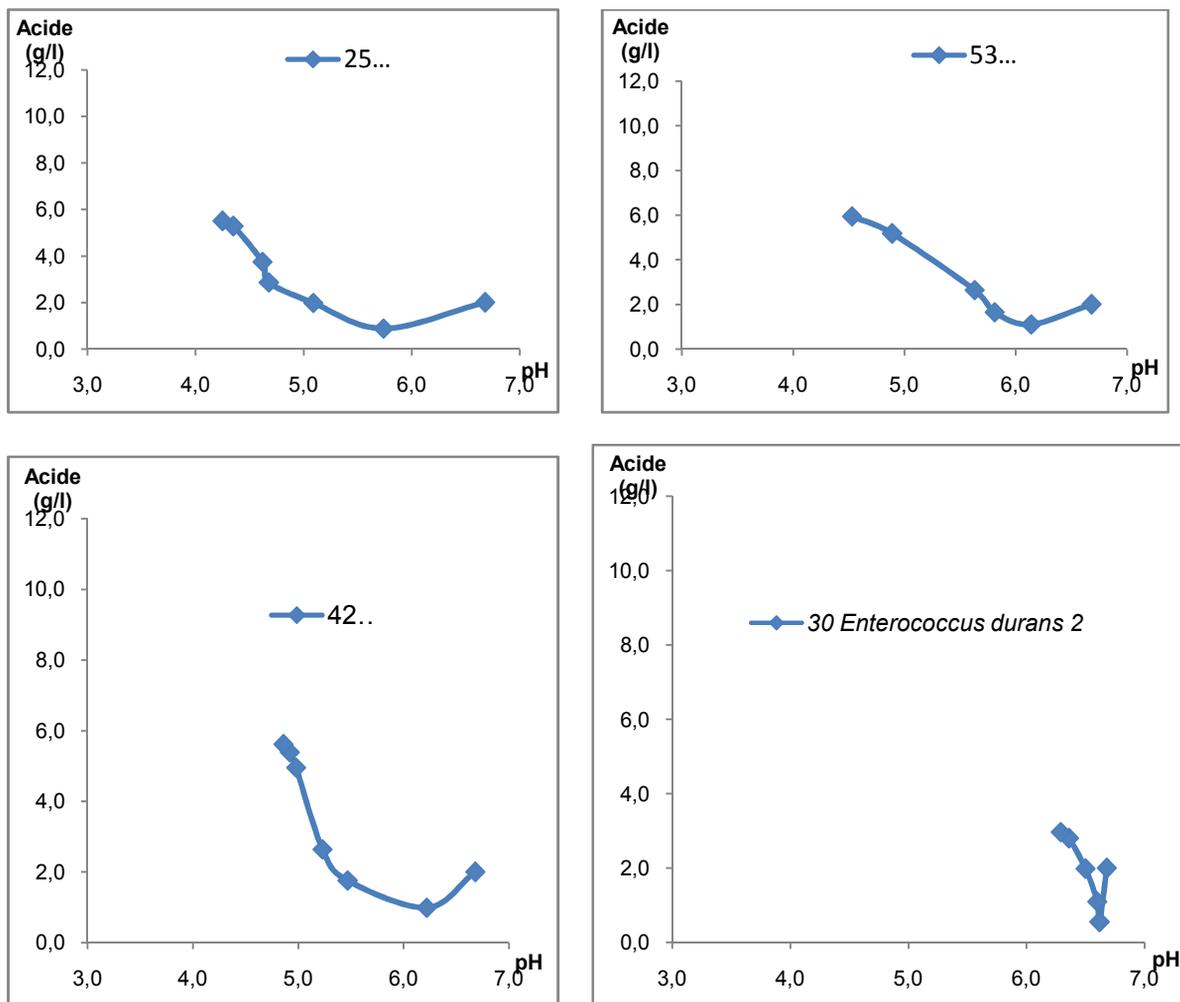


Figure 10: Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Enterococcus durans* 1(suite) et *Enterococcus durans* 2

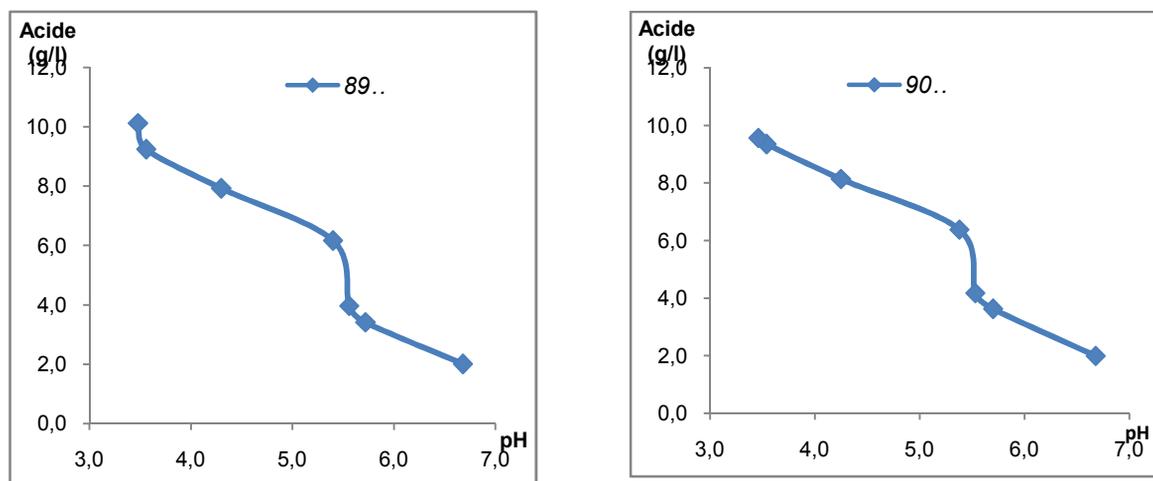


Figure 11 : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Lactococcus lactis subsp lactis* 1

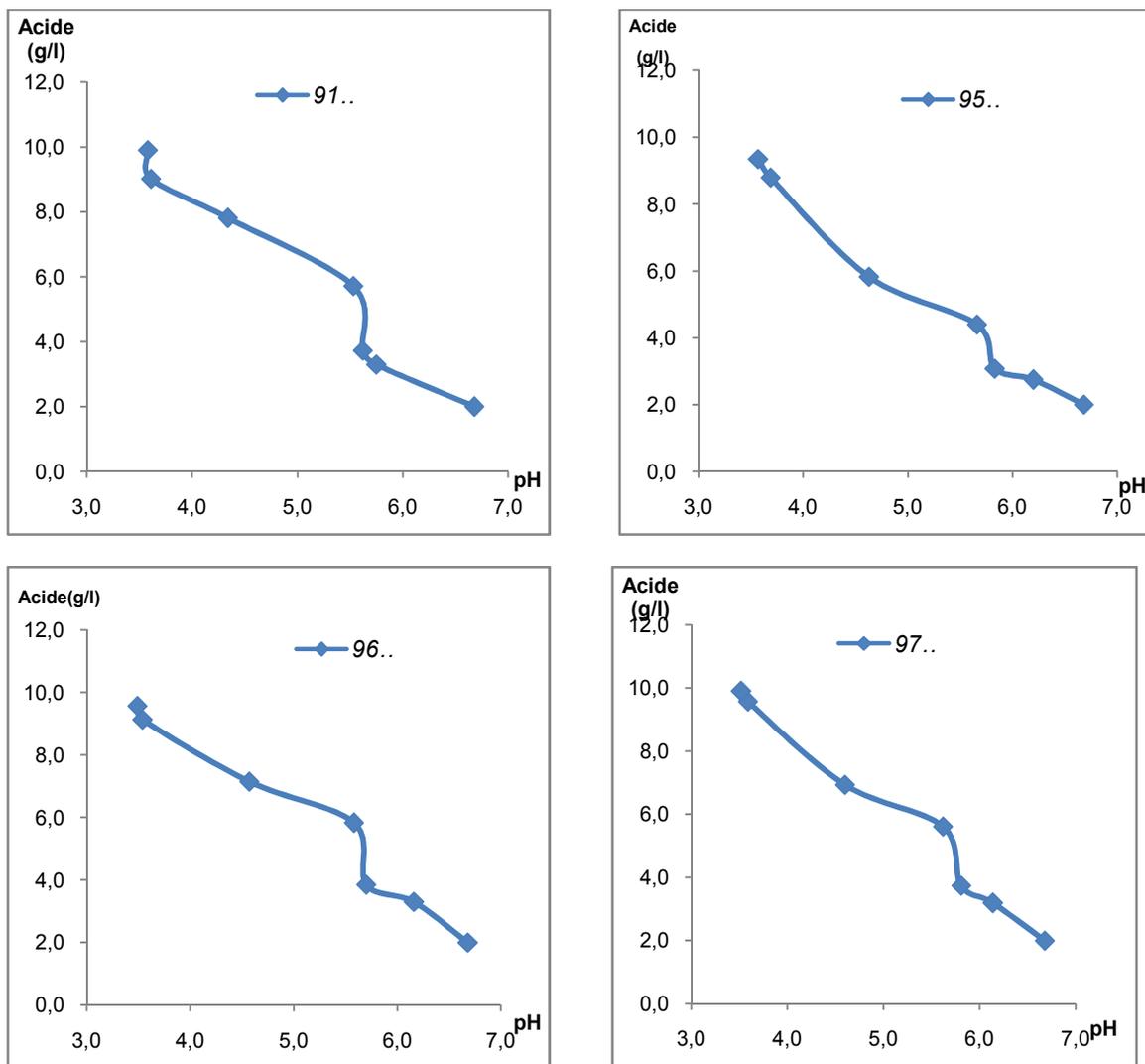


Figure 11 (suite) : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Lactococcus lactis subsp lactis 1*

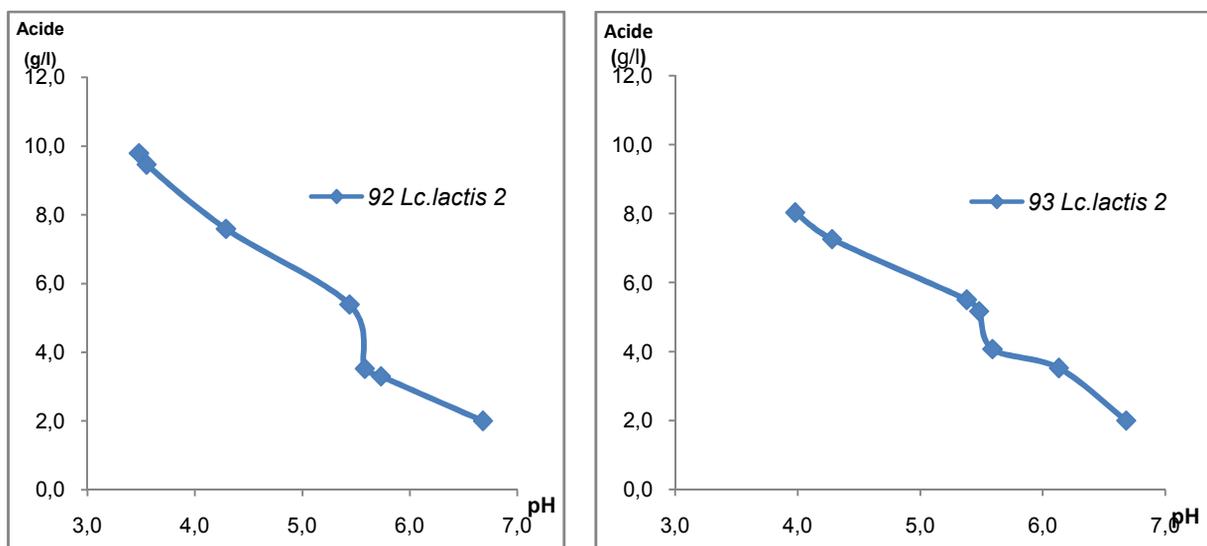


Figure 11 : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Lactococcus lactis subsp lactis (suite)*

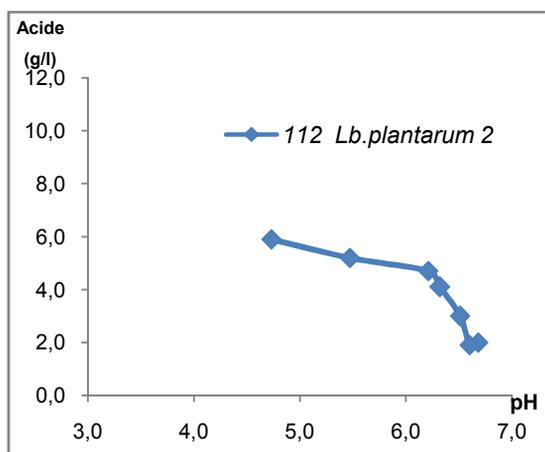
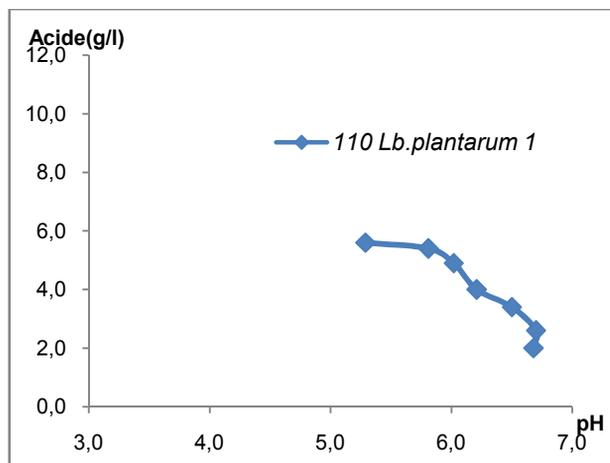
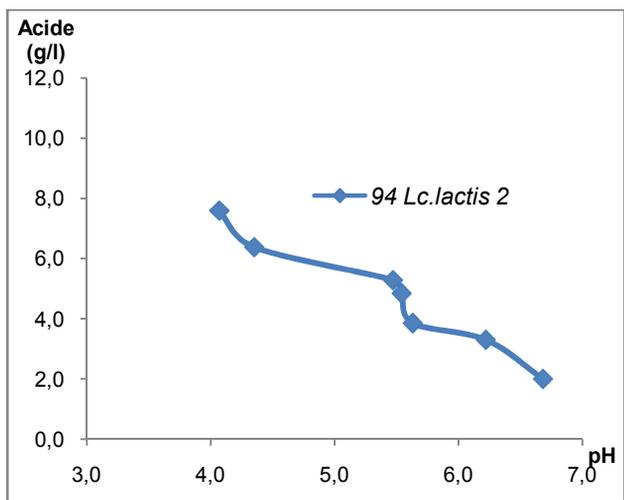


Figure 12 : Variation du pH en fonction de l'acide produit par *Lactococcus lactis subsp lactis* 2 et *Lactobacillus plantarum*

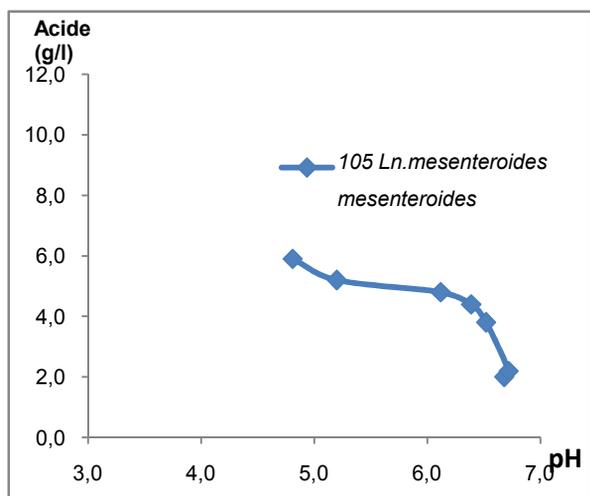
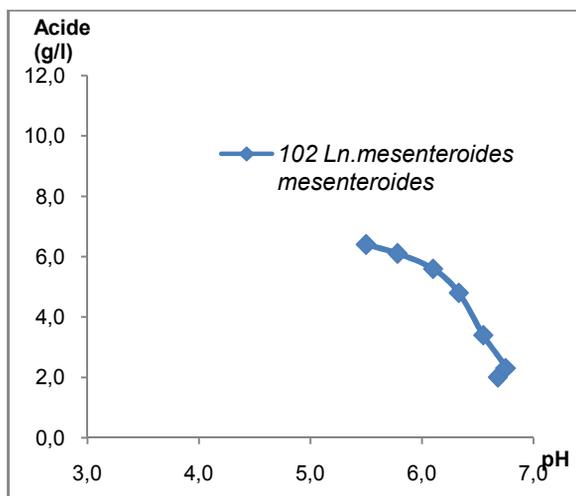


Figure 13 : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*

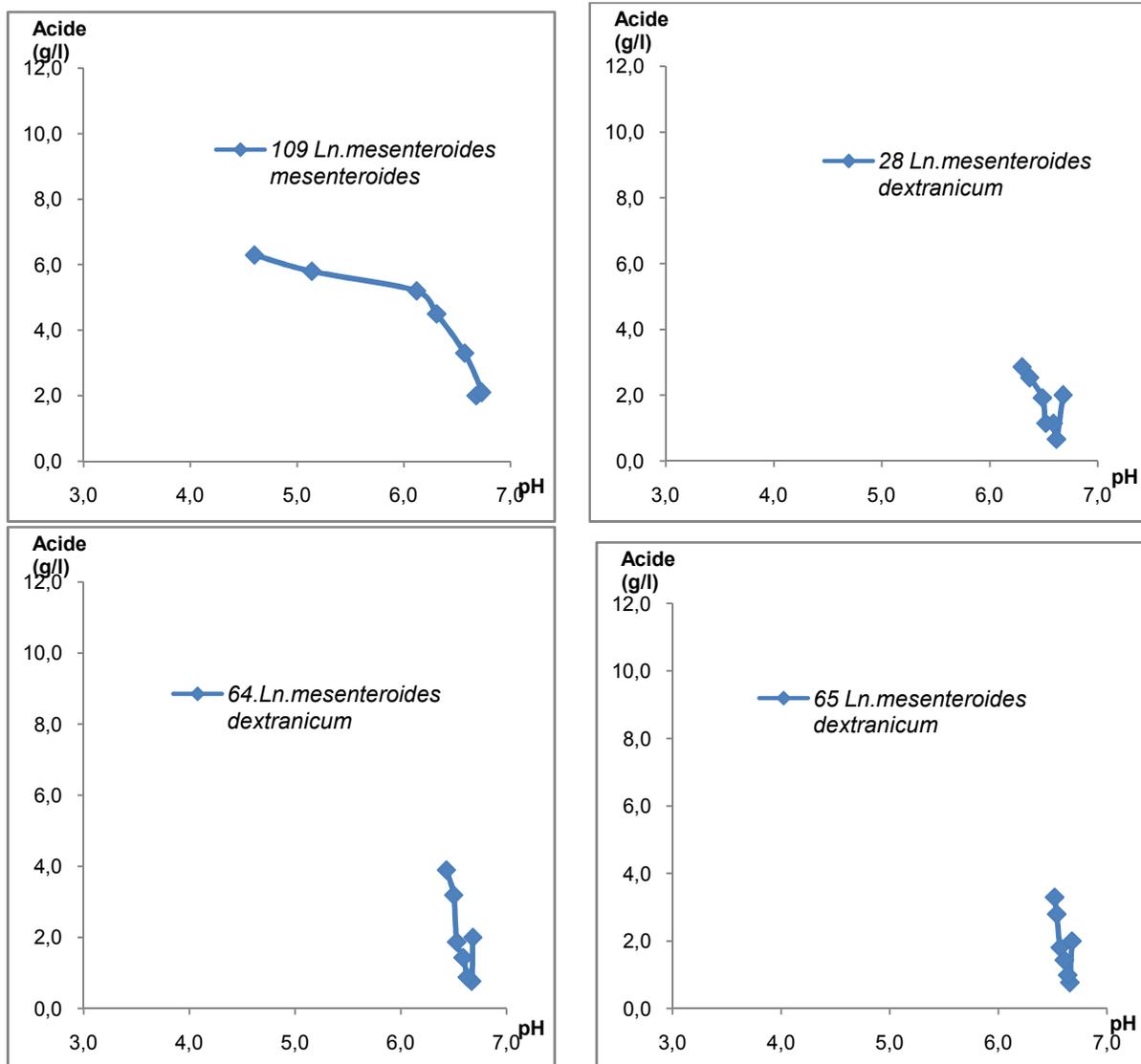


Figure 13 (suite): Variation du pH en fonction d'acide produit par *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* et *Ln mesenteroides subsp dextransicum*

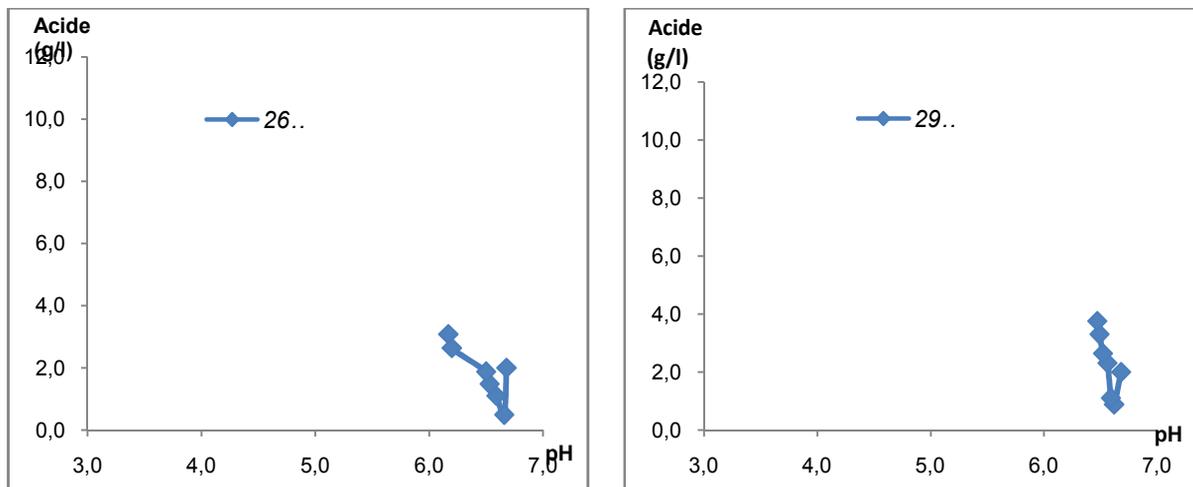


Figure 14: Variation du pH en fonction d'acide produit par *Leuconostoc mesenteroides subsp inconnue*

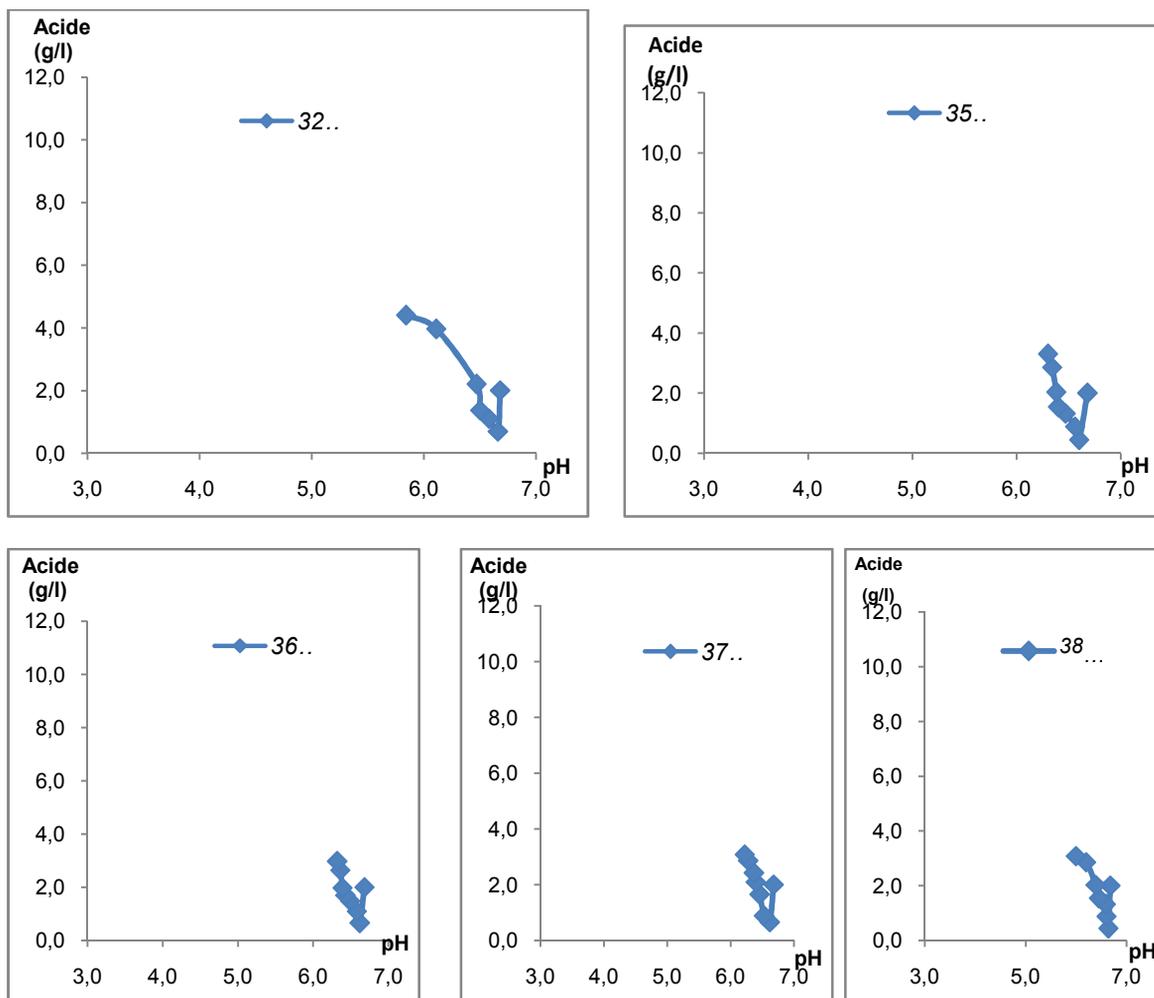


Figure 14 (suite) : Variation du pH en fonction d'acide produit par *Leuconostoc mesenteroides subsp inconnue*

II-Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH

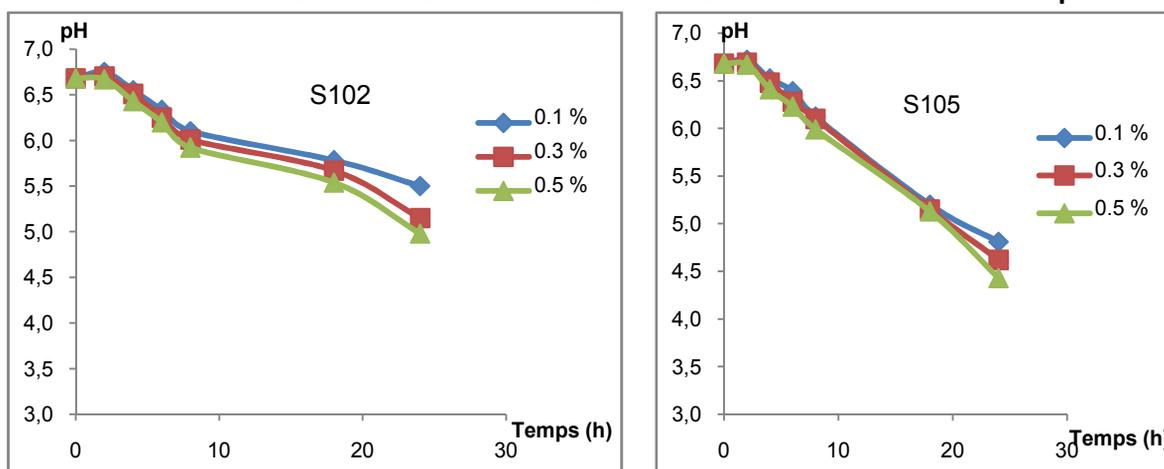


Figure 15: Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps des cultures de *Leuconostoc mesenteroides* en lait reconstitué

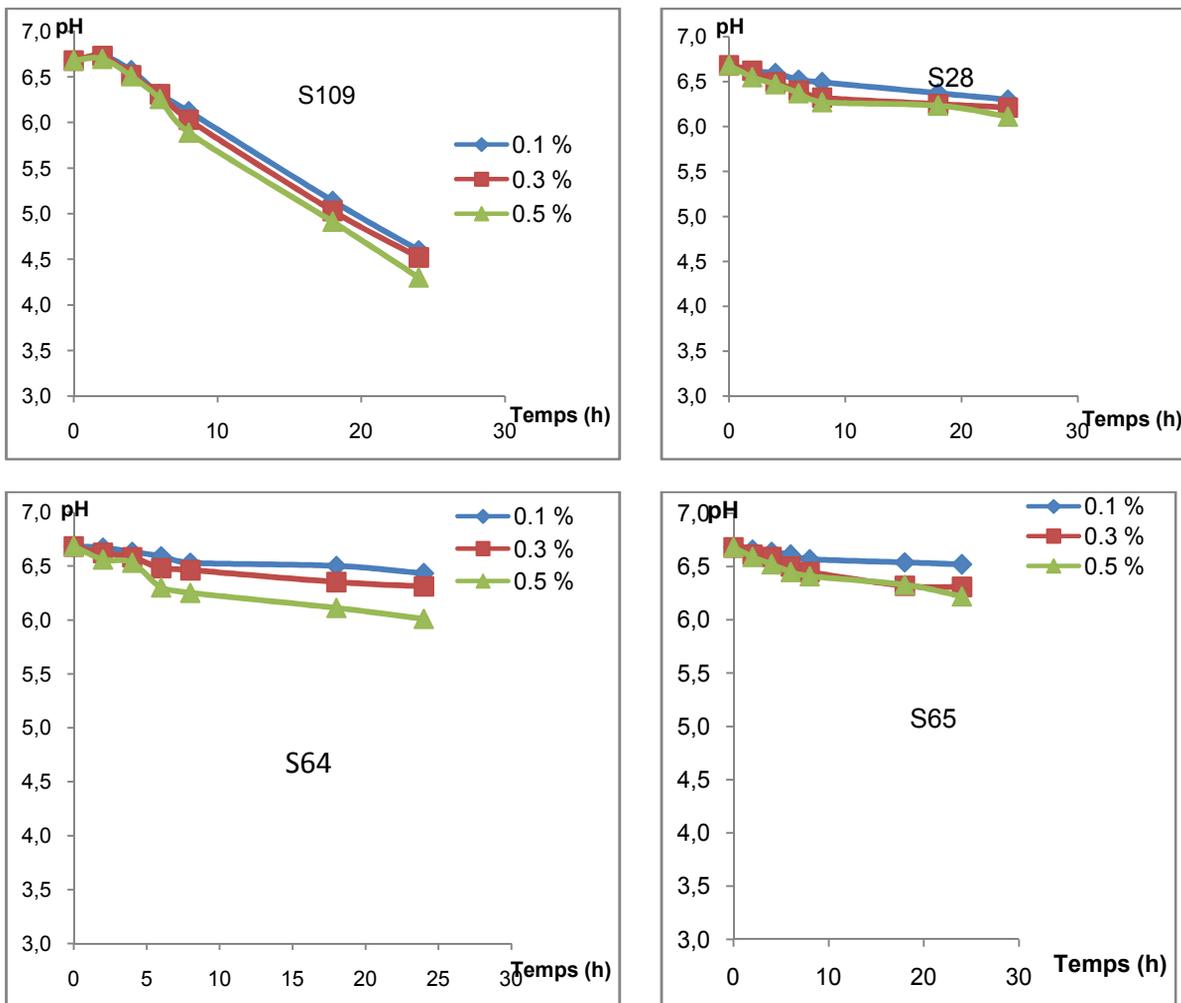


Figure 16: Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH au cours du temps des cultures de *Leuconostoc mesenteroides* et *leuconostoc dextranicum* en lait reconstitué

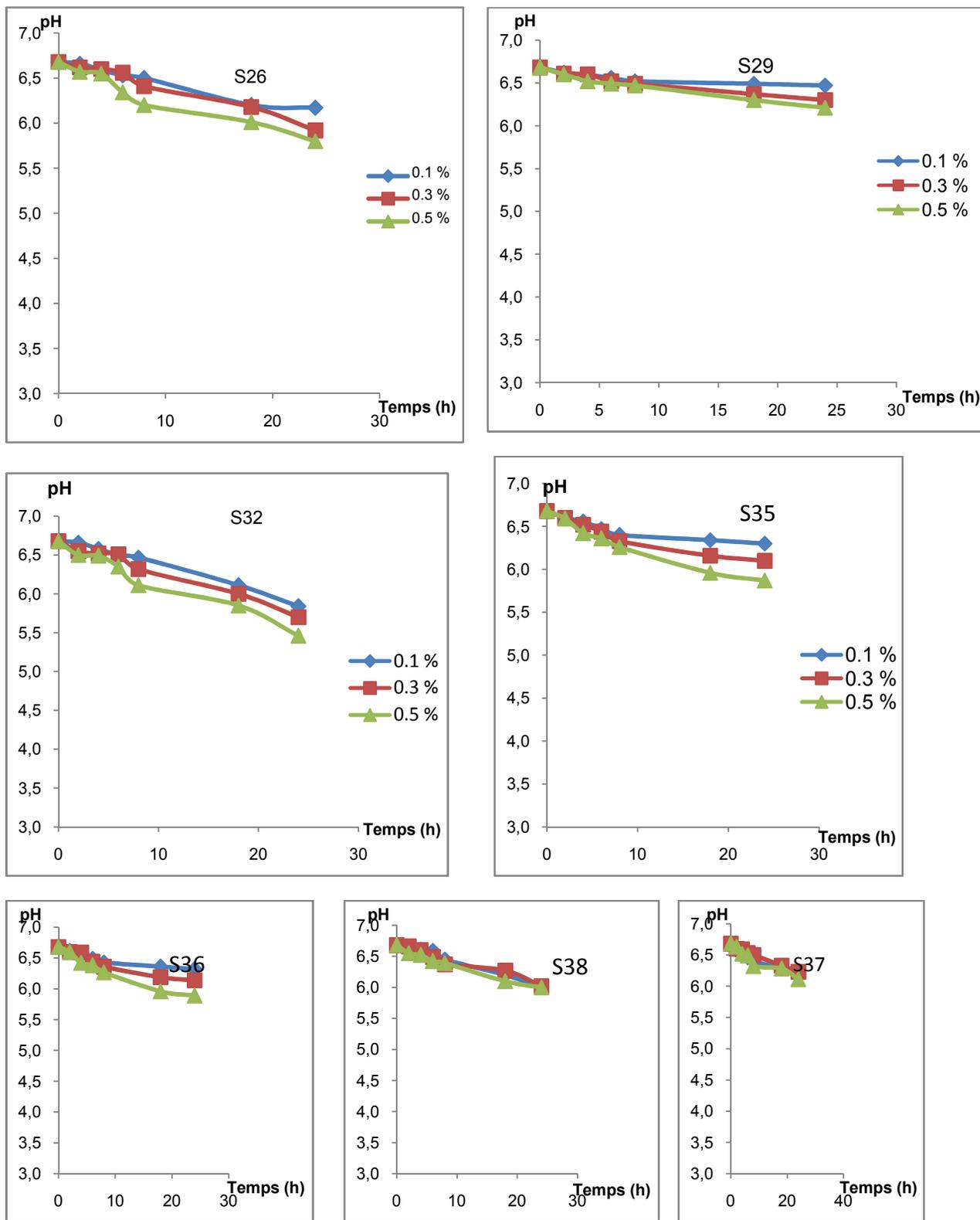


Figure 17 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH en fonction du temps des cultures de *Leuconostoc inconnue*

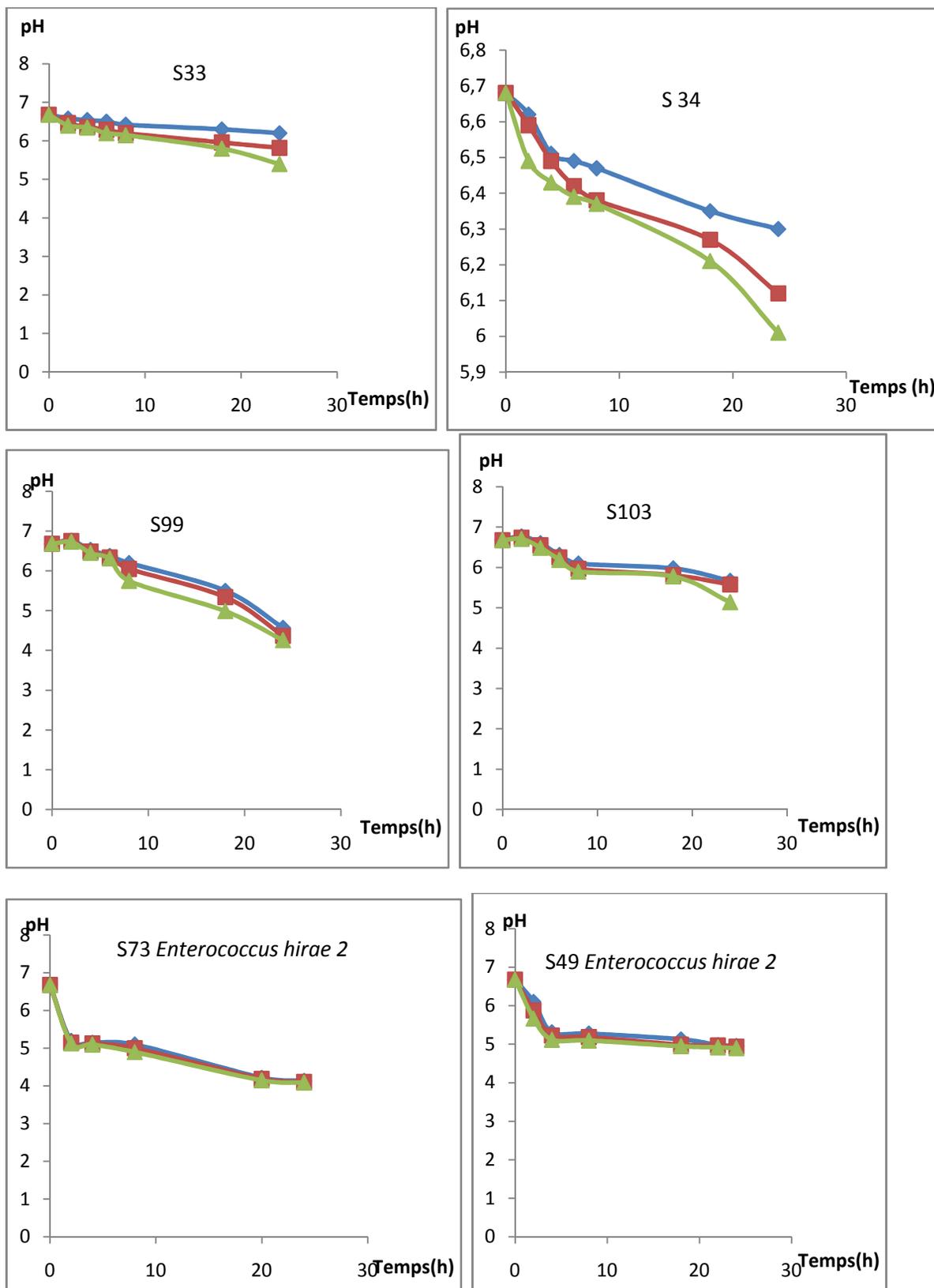


Figure 18: Effet des différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH en fonction du temps des cultures d'*Enterococcus hirae* en lait reconstitué

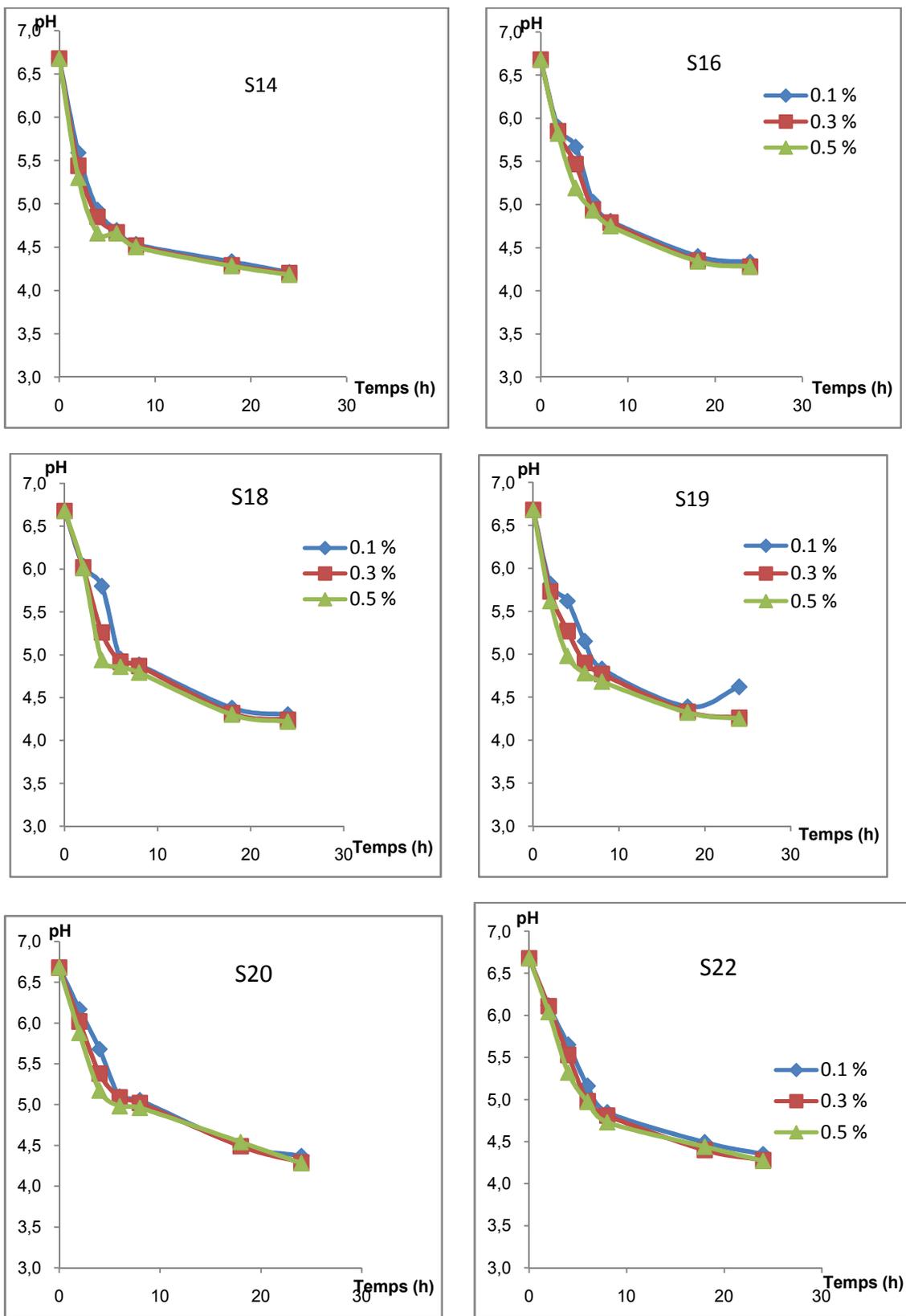


Figure 19 : Effet des différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH des cultures d'*Enterococcus durans*1 au cours du temps.

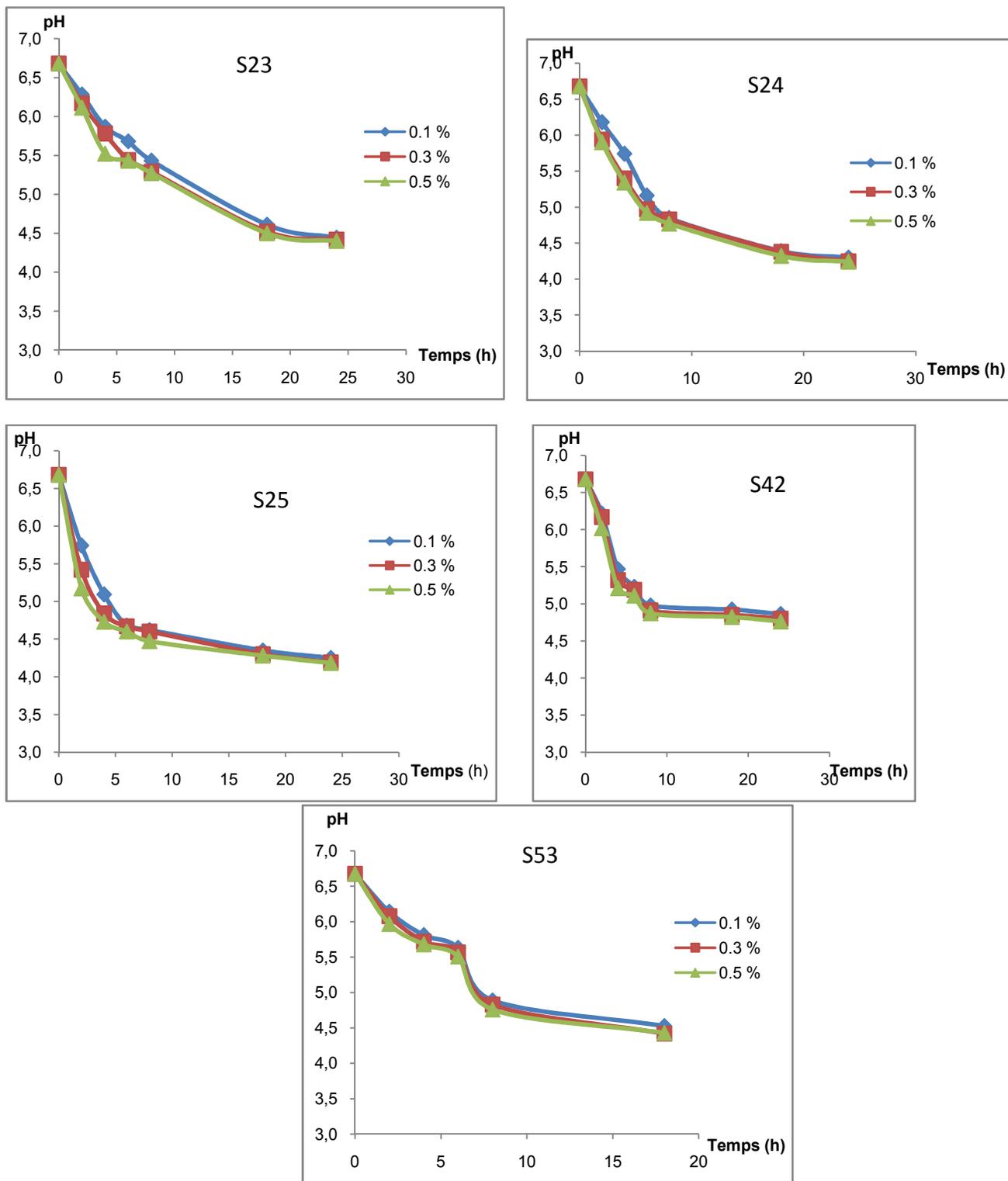


Figure 20 : Effet des différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH des cultures d'*Enterococcus durans1* (suite) au cours du temps

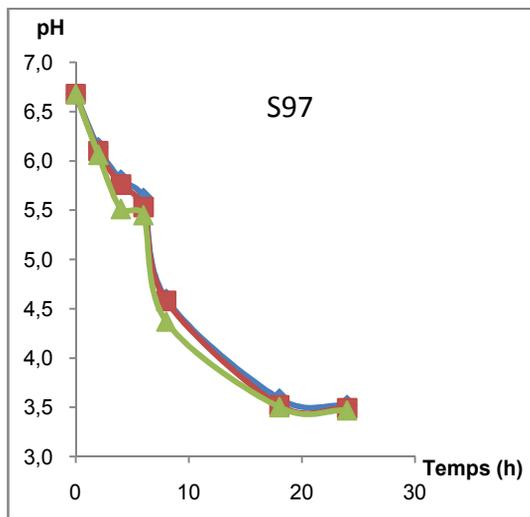
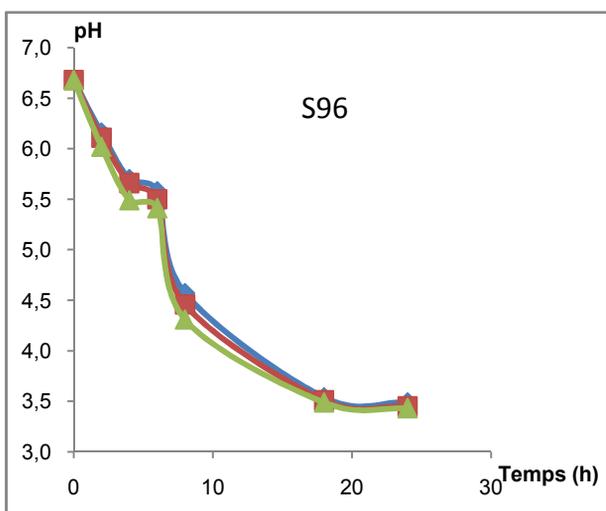
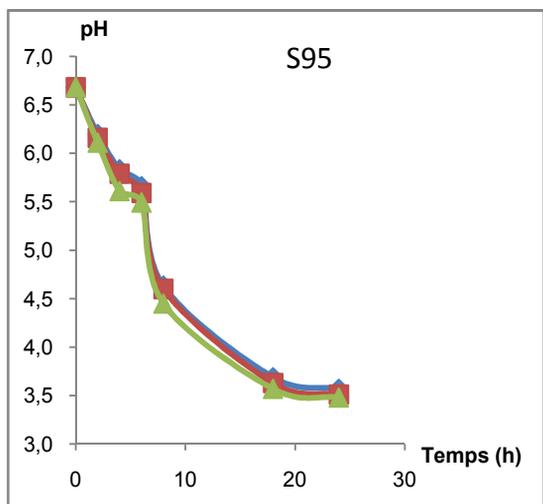
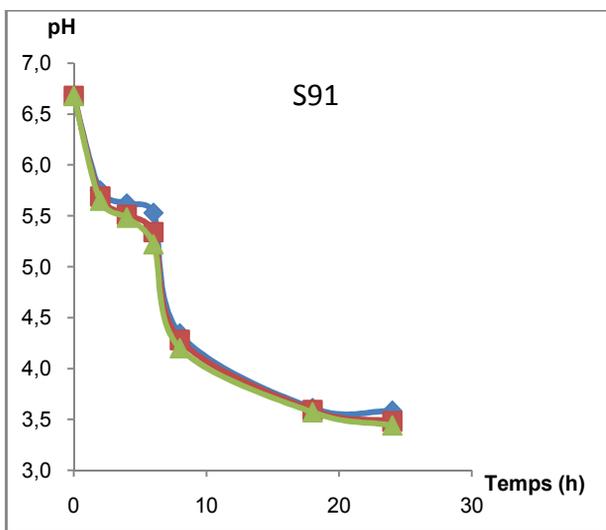
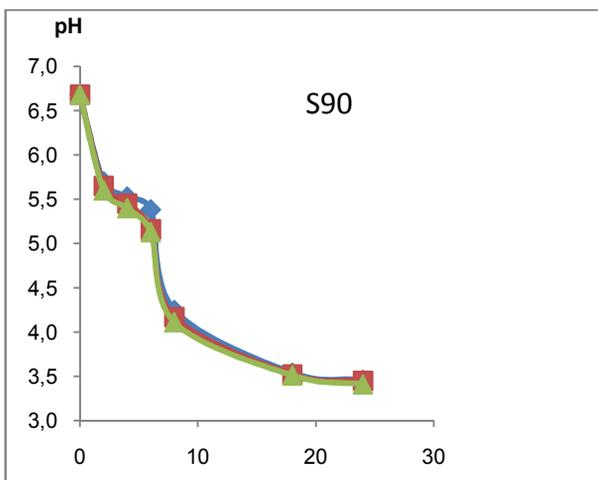
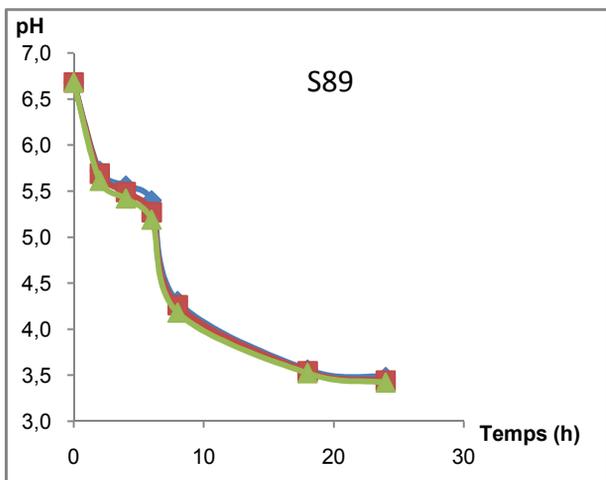


Figure 21 : Effet des différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH des cultures de *Lactococcus lactis1* au cours du temps

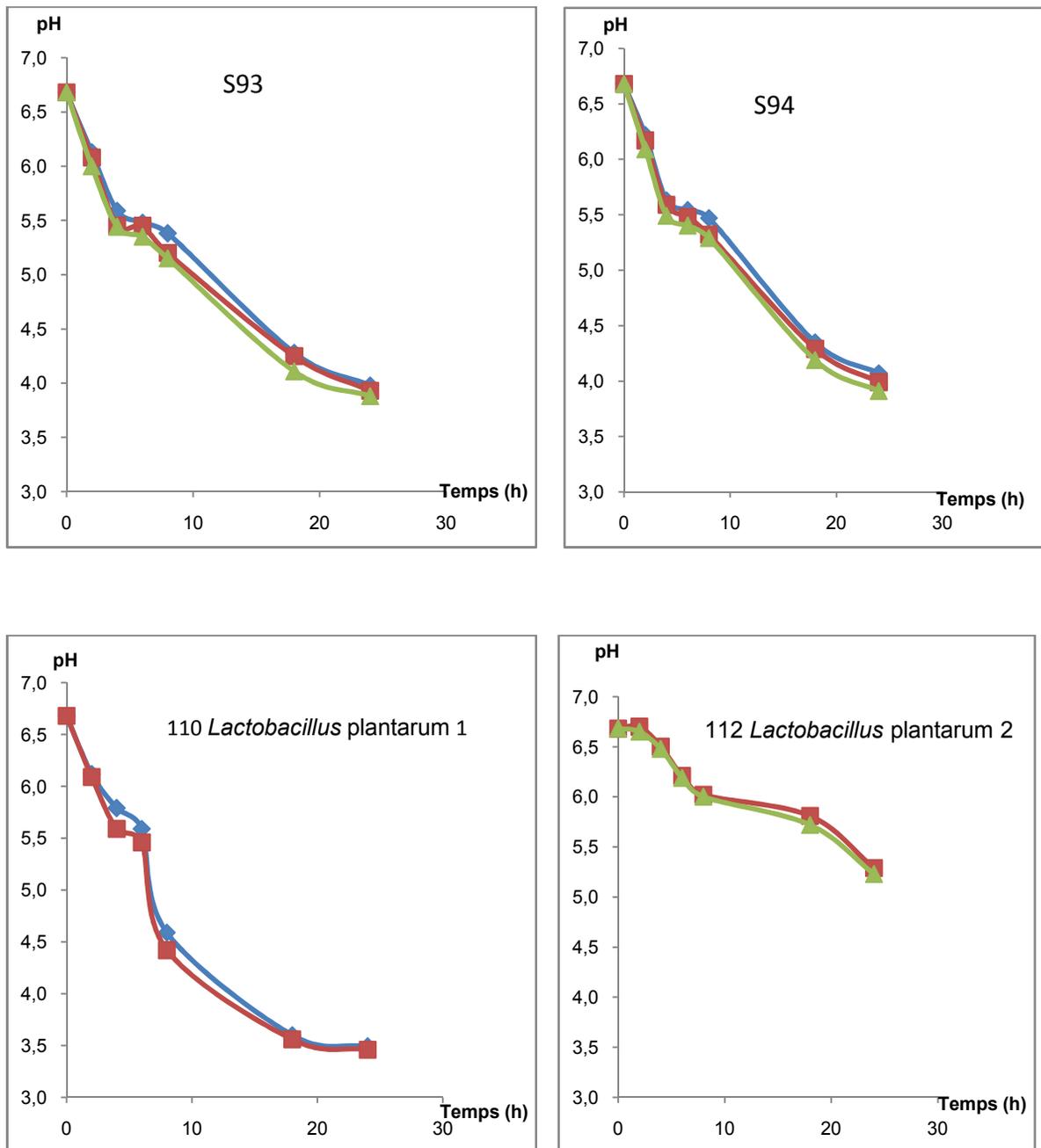


Figure 22 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation du pH des cultures de *Lactococcus lactis* 2 et *Lactobacillus* au cours du temps.

**III-Effet des différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide**

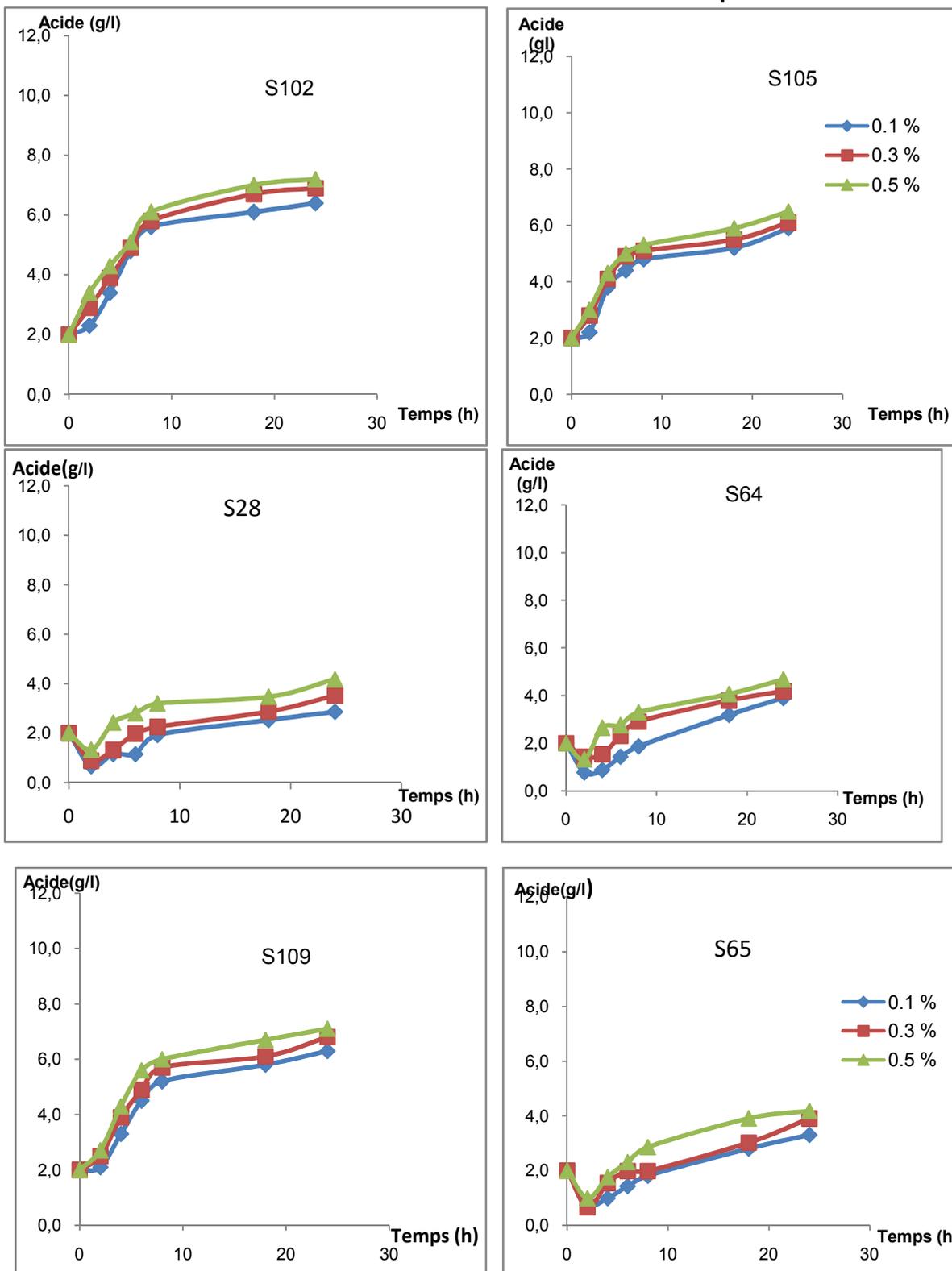


Figure 23 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide par *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc dextransicum*

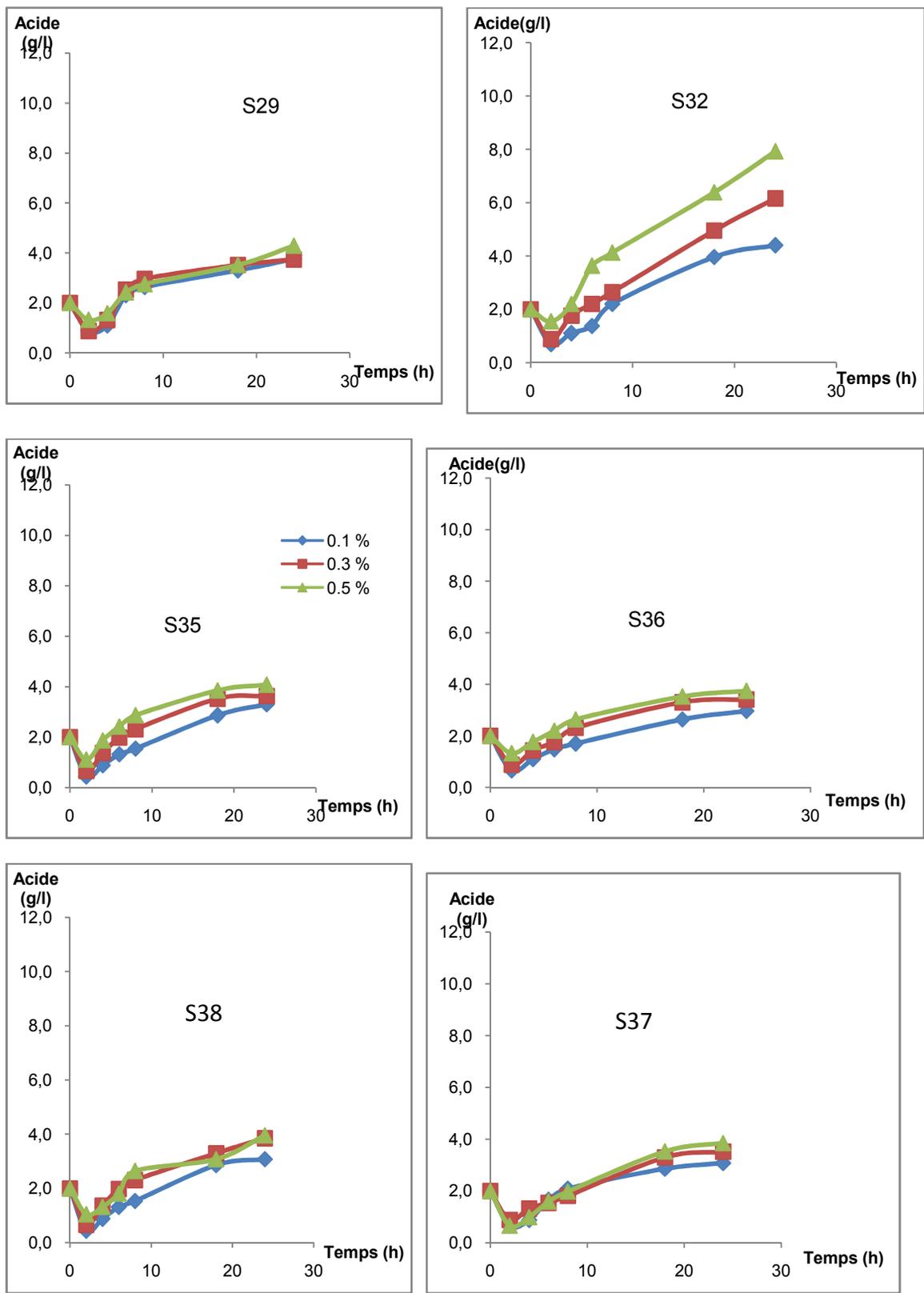


Figure24 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide par *Leuconostoc mesenteroides subsp inconue* au cours du temps

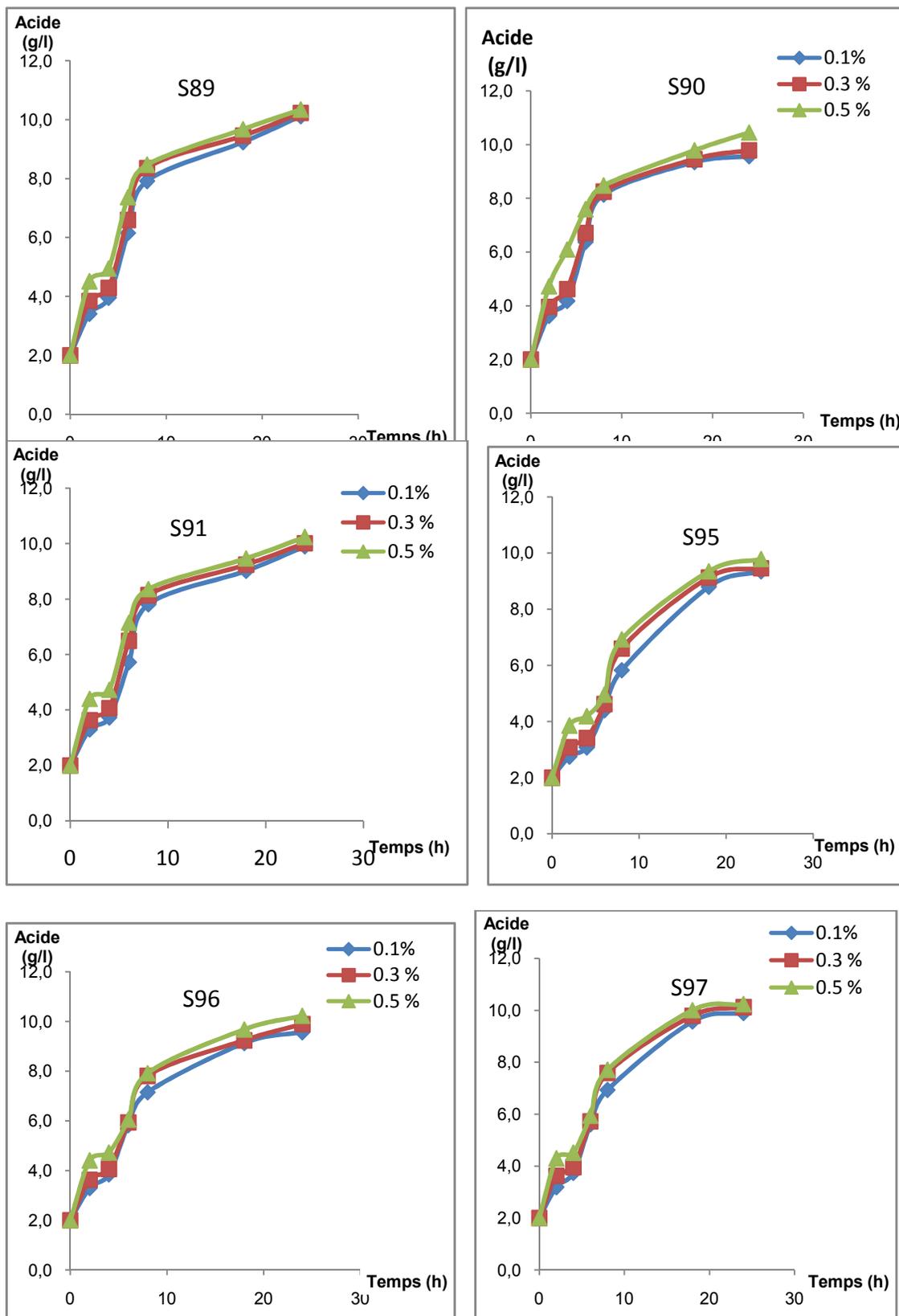


Figure 25: Effet de l'extrait de levure sur la production d'acide des *Lactococcus lactis1*

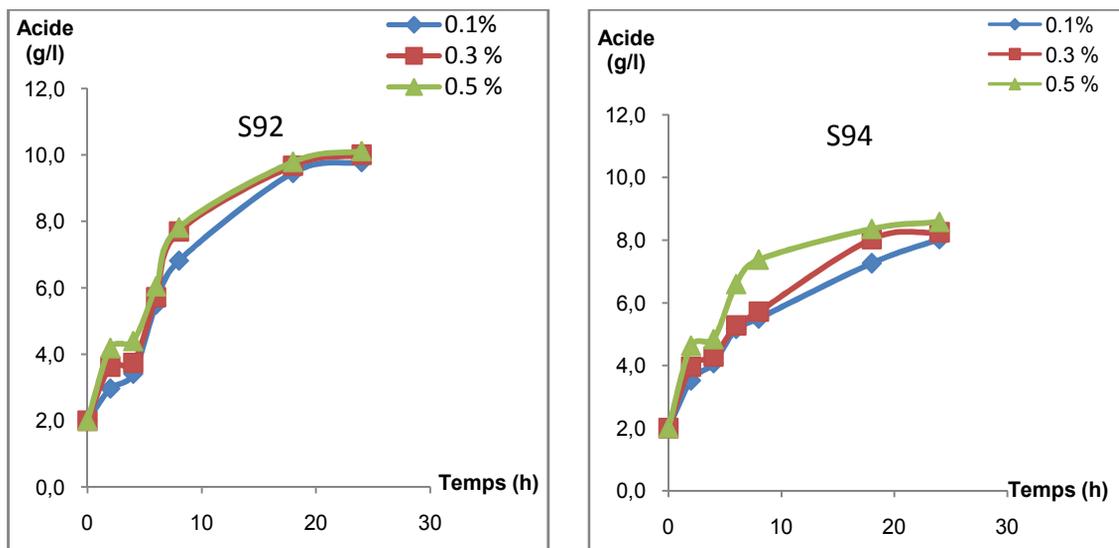


Figure26 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide par *Lactococcus lactis 2* au cours du temps

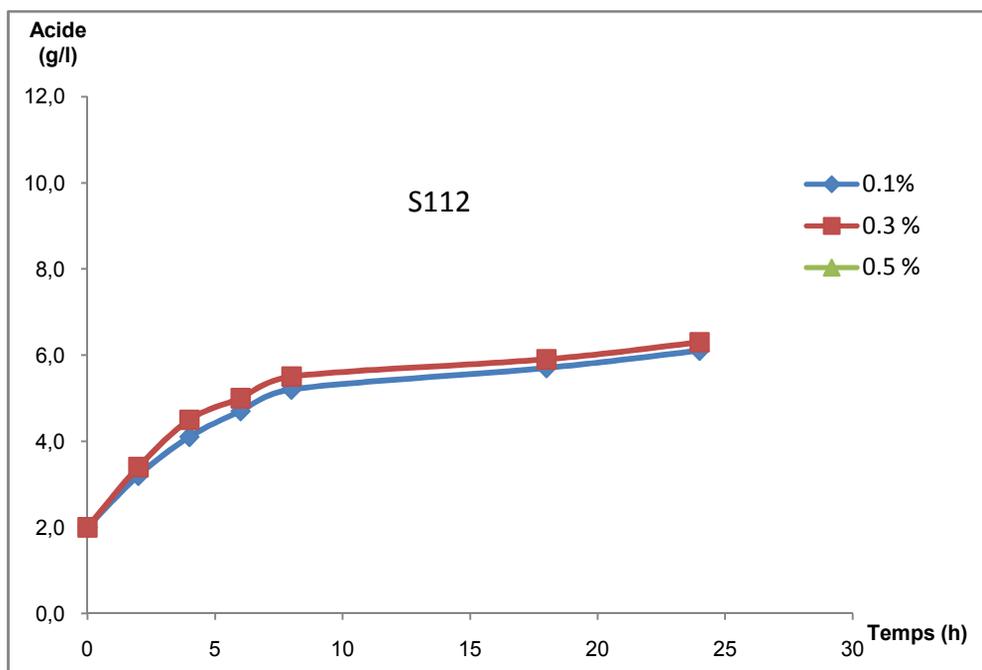


Figure 27 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide par *Lactobacillus* au cours du temps

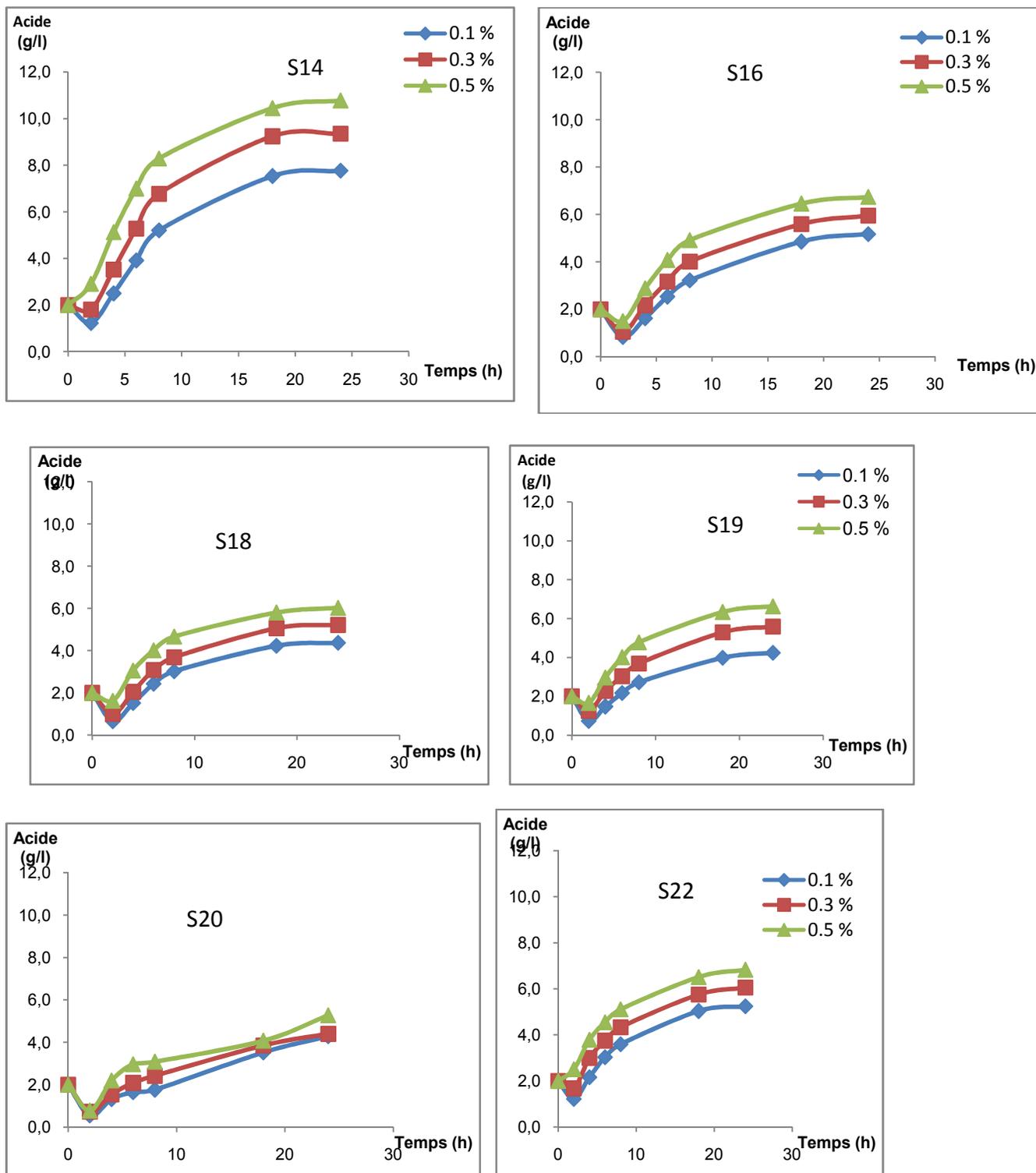


Figure 28 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'acide par *Enterococcus durans1* au cours du temps

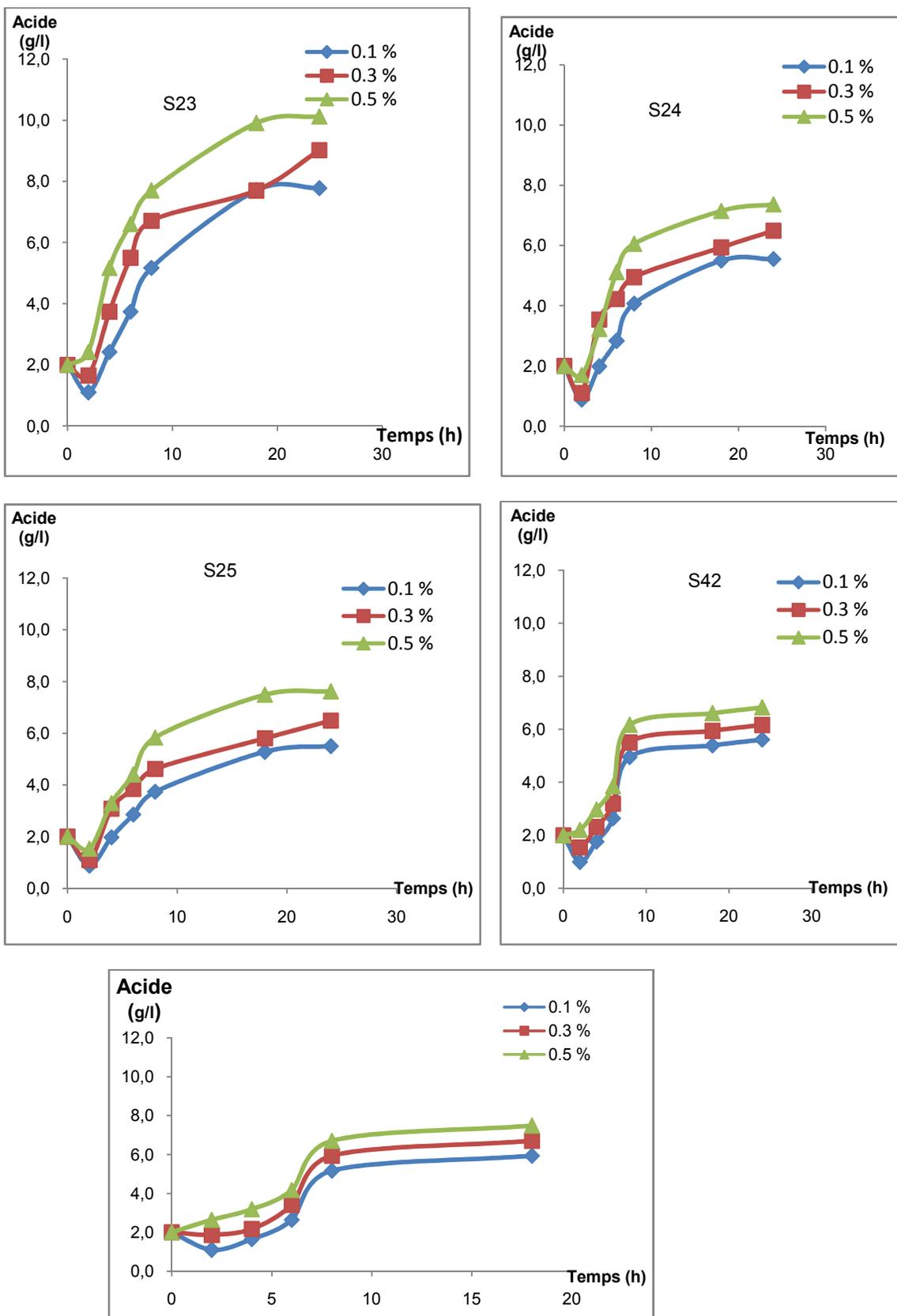


Figure : 29 Effet de l'extrait de levure sur la production d'acide chez *Enterococcus durans1*(suite)

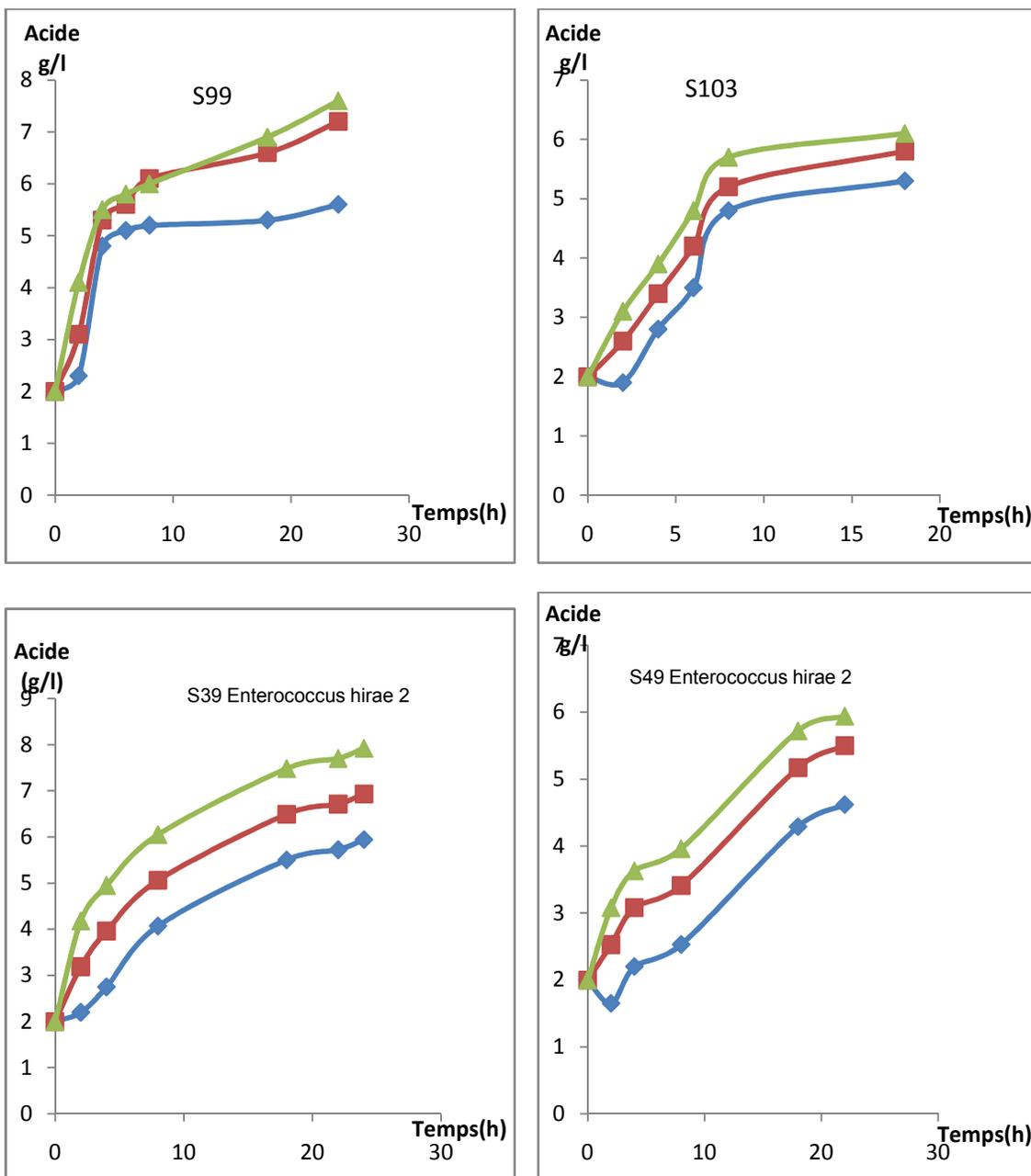


Figure 30 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation d'acide produit par *Enterococcus hirae* au cours du temps

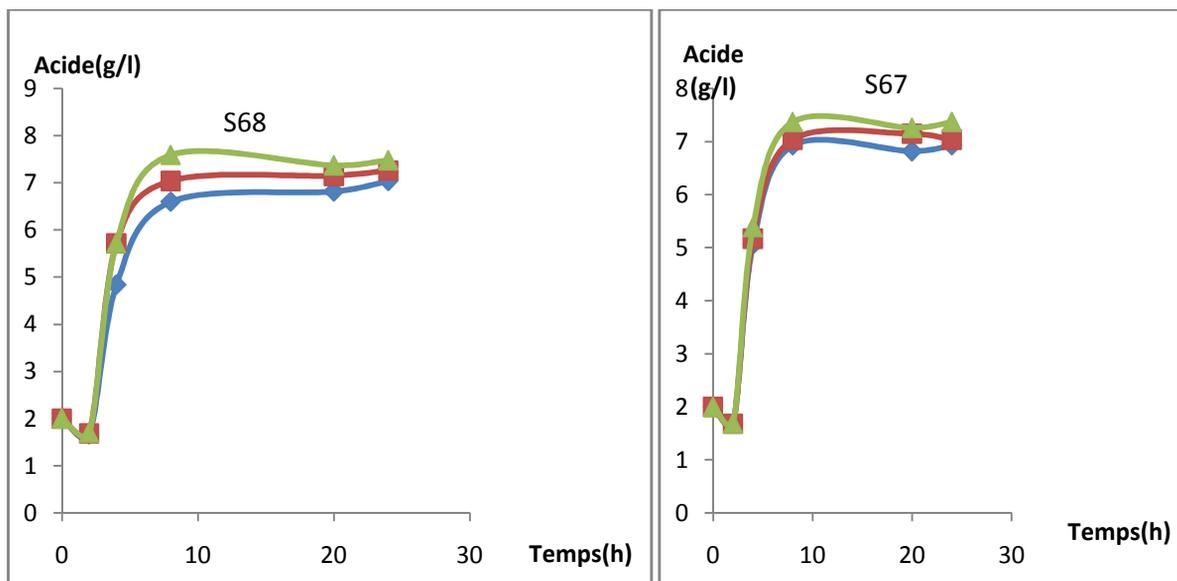


Figure 31: Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la variation d'acide produit par *Enterococcus faecalis* au cours du temps

## ANNEXES II

### Recherche du NPP et test IMVIC

#### I-Recherche du NPP (Nombre le Plus Probable)

##### *I.1-Technique*

Trois dilutions du produit sont préparées. Chaque dilution estensemencée dans trois tubes de BLBVB (bouillon lactosé bilié au vert brillant) (composition en annexe IV) avec cloche de Durham, à raison de 1ml par tube. Après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C, la présence de gaz, ainsi que le virage au jaune des tubes de BLBVB confirment la présence des coliformes dans l'échantillon. Le nombre de tubes positifs pour chaque dilution est compté, la somme correspond au nombre caractéristique. Le résultat est exprimé dans la table de Mac Credy (ci-dessous) par le nombre le plus probable (NPP) de coliformes dans un millilitre ou 1 gramme de produit.

##### *I.2-Table de Mac Credy (3 tubes/dilution)*

Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml
000	0.3	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
100	0.4	211	0.0	312	11.5
011	0.6	212	3.0	313	16.5
101	0.7	220	2.0	320	9.5
110	0.7	221	3.0	321	15.0
111	1.1	222	3.5	322	20.0
020	0.6	223	4.0	323	30.0
102	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

**II-Test IMVIC (identification des coliformes)**

Les techniques d'ensemencements et les résultats positifs ou négatifs obtenus des différents milieux cités dans le tableau ci-dessous sont expliqués dans : Matériel et méthode ; § V.3 et VII.1.

**Tableau** : Identification des coliformes par le test IMVIC (Leveau et Bouix, 1993)

<b>Microrganismes</b>	<b>Lactose</b>	<b>Glucose</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Indole</b>	<b>Rouge de Méthyle</b>	<b>Acétoïne</b>	<b>Citrate</b>	<b>Mobilité</b>
<i><b>E. coli</b></i>	±	+	-	±	+	-	-	±
<i><b>Citrobacter</b></i>	+	+	±	±	+	-	+	+
<i><b>Klebsiella</b></i>	+	+	-	±	-	+	+	-
<i><b>Enterobacter</b></i>	+	+	-	±	-	+	+	+

## ANNEXE III

### ANALYSES SENSORIELLES

#### I-Questionnaire

##### ***I-1-Test triangulaire selon le goût***

Trois échantillons de fromage frais vous sont présentés, dont l'un est répété, selon la disposition suivante :

1       2       3

Dégustez-les. Quel est l'échantillon non répété ?

##### ***I-2-Test de classement selon l'acidité***

Trois échantillons de fromage frais vous sont présentés au sommet d'une tour.

Selon le degré d'acidité classez-les du plus acide au moins acide, du plus consistant au moins consistant, du plus aromatique au moins aromatique, et du plus apprécié au moins apprécié

1

2

3

## II-Résultats des analyses sensorielles

### II-1-Epreuve triangulaire

**Tableau 1:** Résultats d'épreuve triangulaire selon « l'aspect externe »

Disposition	Nombre de réponses correctes	Nombre de réponses incorrectes	Total	$\mu$ observée
RRI	16	0	16	5.39
SSI	16	0	16	5,39
IIR	10	6	16	2.20
RRS	14	2	16	4.33
IIS	14	2	16	4.33
SSR	15	1	16	4.86

**Tableau 2:** Résultats d'épreuve triangulaire selon « le goût »

Disposition	Nombre de réponses correctes	Nombre de réponses incorrectes	Total	$\mu$ obsevée
RRI	5	11	16	-0.44
SSI	3	13	16	-1,50
IIR	15	1	16	4.86
RRS	14	2	16	4.33
IIS	8	8	16	1.14
SSR	15	1	16	4.86

**II-2-Epreuve de classement****Tableau 3:** Résultats du test de classement pour le critère « consistance »

	Fromage S	Fromage I	Fromage R	Total
S>I>R	6	12	18	36
I>S>R	12	6	18	36
I>R>S	6	2	4	12
S>R>I	2	6	4	12
Rj	26	26	44	96

Khi 2 =13.50 pour un ddl=2

donc sans doute  $R < (S = I)$

**Tableau 4 :** Résultats du test de classement pour le critère « acidité »

	Fromage S	Fromage I	Fromage R	Total
S>I>R	5	10	15	30
I>S>R	8	4	12	24
I>R>S	3	1	2	6
S>R>I	6	18	12	36
Total	22	33	41	96

Khi 2 =11.37 pour un ddl=2

donc sans doute  $S > I \geq R$

**Tableau 5:** Résultats de test de classement pour le critère « arôme »

	Fromage S	Fromage I	Fromage R	Total
R>S>I	12	18	6	36
I>S>R	4	2	6	12
S>I>R	5	10	15	30
S>R>I	1	3	2	6
R>I>S	6	4	2	12
Total	28	37	31	96

Khi 2 = 2.62 pour un ddl=2

donc non significatif

**Tableau 6:** Résultats de test de classement pour le critère « appréciation générale»

	Fromage S	Fromage I	Fromage R	Total
S>I>R	1	2	3	6
R>S>I	20	30	10	60
R>I>S	15	10	5	30
Total	36	42	18	96

Khi 2 = 19.5 pour un ddl = 2

donc sans doute R>(S = I)

## III- Table du Khi2

<b>v / *</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.025</b>	<b>0.01</b>	<b>v /</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.025</b>	<b>0.01</b>
<b>1</b>	2.71	3.84	5.02	6.63	<b>16</b>	23.54	26.30	28.84	32.00
<b>2</b>	4.61	5.99	7.38	9.21	<b>17</b>	24.77	27.59	30.19	33.41
<b>3</b>	6.25	7.81	9.35	11.34	<b>18</b>	25.99	28.87	31.53	34.80
<b>4</b>	7.78	9.49	11.14	13.28	<b>19</b>	27.20	30.14	32.85	36.19
<b>5</b>	9.24	11.07	12.83	15.09	<b>20</b>	28.41	31.41	34.17	37.57
<b>6</b>	10.64	12.59	14.45	16.81	<b>21</b>	29.61	32.67	35.48	38.93
<b>7</b>	12.02	14.07	16.01	18.47	<b>22</b>	30.81	33.92	36.78	40.29
<b>8</b>	13.36	15.51	17.53	20.09	<b>23</b>	32.01	35.17	38.08	41.64
<b>9</b>	14.68	16.92	19.02	21.67	<b>24</b>	33.20	36.41	39.37	42.98
<b>10</b>	15.99	18.31	20.48	23.21	<b>25</b>	34.38	37.65	40.65	44.31
<b>11</b>	17.27	19.67	21.92	24.72	<b>26</b>	35.56	38.88	41.92	45.64
<b>12</b>	18.55	21.03	23.34	26.22	<b>27</b>	36.74	40.11	43.19	46.96
<b>13</b>	19.81	22.36	24.74	27.69	<b>28</b>	37.92	41.34	44.46	48.28
<b>14</b>	21.06	23.68	26.12	29.14	<b>29</b>	39.09	42.56	45.72	49.59
<b>15</b>	22.31	25.00	27.49	30.58	<b>30</b>	40.26	43.77	46.98	50.89

\*v : le nombre de degré de liberté; l : le risque d'erreur.

## ANNEXES IV

### MILIEUX DE CULTURES

#### I-GÉLOSES/BOUILLONS correspondant

Les bouillons contiennent les mêmes quantités de tous les ingrédients, sauf l'agar –agar.

#### Gélose/Bouillon MRS : « De Man-Rogosa-Sharpe (1960)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Peptone	10
Acétate de sodium	5
Citrate de sodium	2
Glucose	20
MgSO <sub>4</sub>	0,25
MnSO <sub>4</sub>	0,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Agar-agar	15 (uniquement gélose)
Tween 80	1 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH= 6,8**

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn

**Gélose/Bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Tryptone	5
Peptone papainique	2,5
Peptone pepsique de viande	5
Acide ascorbique	0,5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19
Mg SO <sub>4</sub>	0,25
Agar-agar	15 (uniquement gélose)
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH =7,1**

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn

**Gélose YMA (Yeast-Milk –Agar (1960)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Extrait de levure	3
Peptone	5
Lait déshydraté	10
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH = 7,0**

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn.

**Gélose MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Tryptone	10
Extrait de levure	5
Saccharose	100
Citrate de sodium	1
Glucose	5
Gélatine	2,5
Azohydrate de sodium	0,075
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 6,5**

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

**Gélose ME (milieu pour entérocoques)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantité en gramme</i></b>
Tryptone	20
Extrait de levure	5
Dextrose	2
Dipotassium phosphate	4
Azide de sodium	0,4
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
Agar	10
2.3.5 Triphenyl Tetrazolium chloride	0,1

**pH 7,2 ± 0,2**

Autoclaver à 121°C pendant 15mn

**Gélose M16 BCP (Thomas , 1973)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Peptone papainique de soja	5
Bi-polytone	5
Acide ascorbique	0,5
Lactose	2
L-arginine	4
Pourpe de bromocresol	0,5
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH= 6,8**

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

**Gélose KMK (Kempfer et Mac Kay ,1980)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités</i></b>
Poudre de lait écrémé	10
Biopolytone	2,5
Glucose	5
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH= 6,6**

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon puis autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

Au moment de son utilisation on ajoute :

1 ml de solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 10 % (P/V)

1 ml de solution aqueuse de citrate ferrique à 2,5 % (P/V)

1 ml de citrate de sodium 2,5 % (P/V)

Ces solutions sont stérilisées par filtration (Membrane millipores 0,22 µm) avant leur utilisation et doivent être conservées à l'obscurité à 4 °C.

### **Gélose NUTRITIVE**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantité en gramme</i></b>
Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH =7,1**

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

### **Gélose MAC CONKEY**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Peptone de caseine	17
Peptone de viande	3
Lactose	10
Mélange des els biliaries	1,5
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,03
Crystal violet	0,001
Agar –Agar	13,5
Eau distillée q.s.p.	1000ml

**pH 7,1**

Autoclaver à 110 °C pendant 30 mn

**Gélose SS (Salmonella, Shigella)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Extrait de viande de bœuf	5
Polypeptone	5
Lactose	10
Sels biliaires	8,5
Citrate de sodium	10
Thiosulfate de sodium	8,5
Citrate ferrique	1
Rouge neutre	0,025
Vert brillant	0,00033(qqs traces)
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,0**

Ne pas autoclaver, porter à ébullition pendant 1 ou 2mn en agitant fréquemment

**Milieu CHAPMAN**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Peptone	11
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	1
Rouge de phénol	0,025
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7.4 à 7.5**

Autoclaver à 110 °C pendant 30 mn.

**Gélose Viande – Foie (VF)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Base VF déshydraté	20
Glucose	2
Amidon	2
Aga-Agar	11
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,2**

Autoclaver à 115 °C pendant 30 mn

**Gélose à trois sucres et au fer (TSI)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptone	15
Lactose	10
Saccharose	10
Glucose	1
Chlorure ferrique d'ammonium	0,5
Chlorure de sodium	5
Rouge de phenol	0,024
Agar	12
Thiosulfate de sodium	0,3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,5**

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

**Milieu CITRATE DE SIMMONS**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>quantités en grammes</i></b>
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate de mono -ammoniaque	1
Phosphate bipotassique	1
Citrate de sodium	2
Chlorure de sodium	5
Bleu de Bromothymol	0,08
Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 6,8**

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

## **II-BOUILLONS**

### **Bouillon BLBVB (Bouillon lactosé bilié au vert brillant) (Dunham et Schoenlein,1926)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Lactose	10
Peptone	10
Bile déshydratée	20
Vert brillant à 1%	1,3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,2**

Autoclaver à 115 °C pendant 20 mn

### **Milieu ROTHE (S/C) (bouillon glucose à l'azide de sodium)**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Tryptone	20
Glucosr	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate di potasique	2,7
Phosphate monopotassique	2,7
Azothydrate de sodium	0,2
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,2**

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

**Milieu EVA Litsky (bouillon glucosé à l'éthyle violet et azide de sodium)**

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantités en gramme</b>
Tryptone	20
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate di potassique	5
Phosphate monopotassique	2,7
Azohydrate de sodium	0,3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
Solution à 0,01 g d'éthyle Violet dans 100 ml d'H <sub>2</sub> O	5 ml

**pH 7,2**

Autoclaver r à 121 °C pendant 20 mn

**Bouillon au sélinite (SFB)**

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantités en gramme</b>
Sélinite de sodium	5
Peptone trypsine de caseine	4
Lactose	4
Phosphate disodique	40
Cystine	0.02g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH 7,0 ± 0.2

Stériliser à 115 °C pendant 20 mn

### **Bouillon de GIOLITTI et CANTONI**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en gramme</i></b>
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de lithium	5
Mannitol	20
Chlorure de sodium	5
Glycine	1.2
Pyruvate de sodium	3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 6,8 à 7,0**

Autoclaver pendant 20 mn à 115 °C

### **Milieu CLARCK ET LUBS**

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantités en grammes</i></b>
Peptone trypsique	5
Glucose	2
Phosphate bipotassique	10
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,5**

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

## **EAU PEPTONNEE EXEMPTEE D'INDOLE**

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantités en grammes</b>
Peptone	20
Chlorure de sodium	20
Phosphate dissodique	9
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

**pH 7,5**

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

*Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation*

**Nahida Bendimerad, Mebrouk Kihal & Françoise Berthier**

**Dairy Science & Technology**

Official journal of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Formerly 'Le Lait'

ISSN 1958-5586

Volume 92

Number 3

Dairy Sci. & Technol. (2012) 92:249-264

DOI 10.1007/s13594-012-0063-8



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by INRA and Springer-Verlag, France. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.**

## Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation

Nahida Bendimerad · Mebrouk Kihal ·  
Françoise Berthier

Received: 15 July 2011 / Revised: 24 February 2012 / Accepted: 23 March 2012 /  
Published online: 26 April 2012  
© INRA and Springer-Verlag, France 2012

**Abstract** *Raib* (*Rayeb*) is a spontaneously fermented milk primarily acidified and flavored by strains of lactococci and leuconostocs. Raib and its by-products are traditionally consumed in many Mediterranean and sub-Saharan countries. Dedicated ready-to-use starter strains are currently missing. The aim of this study was to isolate and characterize wild strains of lactococci and leuconostocs that could be used to produce these dairy products while preserving their traditional characteristics. Dominant lactic acid cocci were isolated on M17 and MRS-vancomycin plates from Algerian cow's, ewe's, goat's, mare's, and camel's milks, either raw and/or fermented under laboratory conditions. The DNA of the isolates was fingerprinted by Rep-PCR. Strain identification was performed by Rep-PCR combined with specific PCR for genus *Enterococcus* and subspecies *lactis/hordniae* and *cremoris* of *Lactococcus lactis*. Isolates were characterized for three phenotypes essential for Raib manufacture: (a) high acidifying activity over the normal associated temperature range, (b) presence of protease, and (c) ability to metabolize citrate. Eighty-four isolates were characterized including four different strains of lactococci and four different strains of leuconostocs. Vancomycin-resistant enterococci were often coisolated. One strain of *Leuconostoc mesenteroides* exhibited an atypical genotype compared to the subspecies-type strains and to other wild *Leuconostoc* strains. Two protease-positive strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* isolated from camel's fermented milks and the

---

N. Bendimerad  
LAMAABE, Biology Department, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria

M. Kihal  
Laboratory of Applied Microbiology, University Es-Senia, Oran, Algeria

F. Berthier (✉)  
INRA, UR342 Dairy Technology and Analysis, 39800 Poligny, France  
e-mail: francoise.berthier@poligny.inra.fr

strain *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* isolated from mare's fermented milks had high acidifying potential in milk. These three strains were considered as suitable candidates as acidifying starters to preserve the typical sensory characteristics of traditional Raib while improving its safety and shelf life.

#### 传统Raib型发酵乳中天然明串珠菌和乳球菌的分离、鉴定以及工艺特性

**摘要:** Raib(Rayeb)是由乳球菌和明串珠菌发酵产酸进而酸化和产生风味的一种自然发酵乳。Raib以及其副产品是许多地中海和撒哈拉以南非洲国家的传统食品。当前尚未有用于发酵Raib的专门发酵剂。本研究目的是分离和鉴定可用于Raib及其副产品的生产,并能保持自身传统特性的天然乳球菌和明串珠菌菌株。在实验室中,采用M17和MRS(含万古霉素)培养基,从新鲜阿尔及利亚牛乳、绵羊乳、山羊乳、马乳、骆驼乳等原料乳或者其发酵乳中,分离了优势乳酸球菌。提取这些菌株的DNA,并且采用Rep-PCR技术对上述菌株指纹图谱分析。采用Rep-PCR技术结合*Enterococcus*属特异性引物、*lactis/hordniae*和*cremoris* of *Lactococcus lactis*亚属特异性引物,对菌株进行鉴定。分离获得菌株的三个与Raib生产相关的特性被确定,其中包括a)在正常的相关温度范围内体现的高酸化能力;b)蛋白酶活性;c)柠檬酸代谢能力。84株菌被定性,其中包括4株乳球菌和4株明串珠菌。具有抗万古霉素的肠球菌,常常被共分离。一株*Leuconostoc mesenteroides*菌与亚种模式菌株以及其他天然明串珠菌相比,显示了非典型的表型特征。两株分离自骆驼发酵乳,并具有蛋白酶活性的*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*和分离自马发酵乳的*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*在乳中显示高的酸化潜力。以上三株菌适合用作酸化发酵剂,它们既可保留传统Raib的传统的感官特性,同时可以改善Raib的安全性和延长货架期。

**Keywords** *Leuconostoc* · *Lactococci* · *Enterococci* · Raib type milk fermentation · Rep-PCR

**关键词** 明串珠菌 · 乳球菌 · 肠球菌 · Raib型发酵乳 · Rep-PCR

## 1 Introduction

There is a need to select novel microbial strains to improve safety of existing traditional fermented dairy products without altering their unique sensory, nutritional, and health-related characteristics; hitherto, strains have mostly been selected for products that have other sensory, nutritional, and health-related characteristics and are manufactured from cow's milk. The selection of strains from dairy ecosystems other than cow's milk and cheeses provides an opportunity to obtain strains which possess unique phenotypes (Drici et al. 2010) and may be useful for new dairy applications as well as traditional ones (Prashant et al. 2009).

Ready-to-use starters dedicated to the manufacture of traditional *Raib* and its by-products are not currently available. The selection of novel strains is crucial to design such starters.

Raib and its by-products are traditional dairy products, still widely produced and consumed in many Mediterranean and sub-Saharan countries (Abou-Donia 2008; Benkerroum and Tamime 2004; Koussou et al. 2007). Raib is consumed directly after fermentation or is skimmed before use. When Raib is churned, *Lben* is obtained from the nonbutter fraction and *Smen* from the butter fraction. *Jben* is a soft white cheese obtained by molding, draining, and salting. The characteristics of Raib and its by-products are broad ranging as they are largely still produced without standardized

procedures. Until recently, they were mostly homemade in rural areas where they make a major contribution to people's diets as well as to the rural economy by promoting local production. Their consumption is increasing in some cities, but has been decreasing among the more prosperous population groups, who have replaced them with industrial-type yoghurts (Khaldi et al. 2006; Koussou et al. 2007). It has been estimated that 30% of Algerian milk output in the 1990s was used to make these products, which were either consumed on-farm or marketed through informal channels (Bencharif 2001).

Traditionally, Raib results from the spontaneous fermentation of full-cream raw cow's, goat's, camel's, or ewe's milks. Cow's milk is also sometimes supplemented with goat's, ewe's, or camel's milk. Fermentation takes place at ambient temperature for 24 to 72 h depending on the temperature. *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* are generally cited as the main lactic acid bacteria (LAB) responsible for its acidification, texture, and aromatization (Benkerroum and Tamime 2004). In that respect, the LAB involved are similar to those used for cultured buttermilk made from cow's milk in developed countries (Vedamuthu 1994). Yeasts are also cited as secondary aroma contributors (Tantaoui-Elaraki and El Marrakchi 1987). All this gives traditional Raib and its by-products specific physicochemical compositions and organoleptic characteristics.

Currently, manufacturing practices are changing for various reasons such as to facilitate large-scale production, production in urban areas, availability of ready-to-use starters and rennet, and hygiene constraints. This results in modification of some essential characteristics such as acidity, levels of solids and volatile compounds, and rheological profiles (Guizani et al. 2001; Samet-Bali et al. 2010). The lactococci that predominated in traditional *Laban* and *Jben* have been replaced by thermophilic lactobacilli in their commercial counterparts (Benkerroum and Tamime 2004; Guizani et al. 2001). Practices for industrial *Laban* manufacturing are actually similar to those for conventional yoghurt in Lebanon (Chammas et al. 2006).

The consumption of ripened cream butter has declined in developed countries and with it, research on dedicated *Leuconostoc* strains. Many successful butter cultures containing good aroma-producing leuconostocs have also been lost because of neglect (Vedamuthu 1994). However, for flavor intensification without an objectionable green flavor defect or excessive gas, leuconostocs should be used in preference to citrate-fermenting lactococci in ripened cream butter made from cow's milk (Vedamuthu 1994). In milk, leuconostocs function only in association with lactococci, which initiate their growth (Vedamuthu 1994).

All previous studies of Raib and its by-products have described LAB isolated from ready-made products or from raw milks. With the exception of one recent study (Ouadghiri et al. 2009), LAB have previously been identified by unreliable phenotypic methods. The present study sets out to isolate wild strains of leuconostocs and lactococci that are well adapted to the different environments in which they are likely to grow. Strains of leuconostocs and lactococci were isolated from raw milks and/or spontaneously fermented raw milks of cow, ewe, mare, goat, and camel under laboratory conditions. They were identified by reliable and accurate genotypic methods, i.e., species-specific PCR when available (Wolfgang 2007) and Rep-PCR (Gevers et al. 2001), and were characterized for their potential as acidifiers and flavoring agents of Raib.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Milk samples

Milks were sampled in spring. To avoid isolating any commercial strains, milks were collected in sterile flasks directly at milking or from the milk can. They were kept at 4 °C until use; all were used within 24 h. To ensure variability among the isolates, samples were taken from 40 different farms.

### 2.2 Strain isolation

MRS-vancomycin (vancomycin at 20 mg.L<sup>-1</sup>) (Mathot et al. 1994) and M17 (Terzaghi and Sandine 1975) were used to isolate leuconostocs and lactococci, respectively. Strains were isolated directly from raw milks or after spontaneous fermentation of raw milks at 30 °C for 48 h (96 h for camel's milks), mimicking traditional fermentation. The aim was to obtain strains that are active during the first production stages and, therefore, common to Raib and its by-products. Aliquots (0.1 mL) of raw or fermented milks were cultivated in MRS-vancomycin broth; then, aliquots from cultures that produced gas in Durham tubes were streaked on MRS-vancomycin plates. Aliquots (0.1 mL) of raw or fermented milks were also cultivated in M17 broth; then, aliquots from cultures that did not produce gas in Durham tubes were streaked on M17 plates. The cultures were incubated aerobically at 30 °C for 24 h.

Isolated colonies were picked off plates and purified by two successive streakings on MRS-vancomycin or M17 plates. By taking only a few isolates from each sample, redundancy among isolates was avoided, and it can be assumed that only dominant strains were isolated from the milks, with strains well adapted to the different milks that are likely to be fermented. The isolates were stored at -20 °C in sterile milk supplemented with glycerol (15%), glucose (0.5%), and yeast extract (0.25%).

### 2.3 Type strains

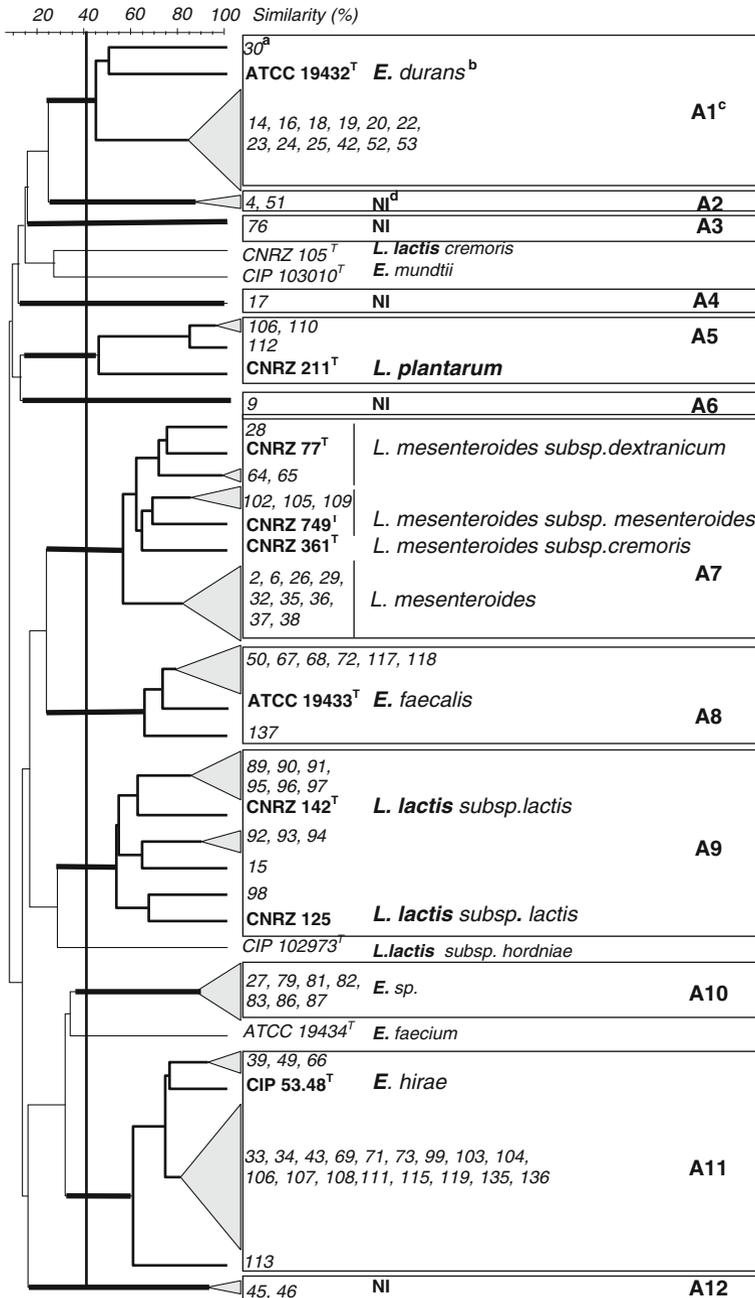
Type strains (see Fig. 1) were obtained from ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); CIP, Collection of the Institute Pasteur (Paris, France); and CNRZ, Collection of the Centre National de la Recherche Zootechnique (INRA, Jouy-en-Josas, France) distributed now by CIRM-BIA (INRA, Rennes, France).

### 2.4 DNA extraction

Each purified isolate and each type strain was streaked on an appropriate agar medium. Total DNA was extracted from one colony by the rapid cold shock method of Gaya et al. (1999).

### 2.5 Rep-PCR

Rep-PCR was performed as described by Berthier et al. (2001), except that the gel image was captured with a CCD camera, and primer (GTG)<sub>5</sub> (5P-GTGGTGGTGGTGGTG-3P) was also used in addition to primers ERIC and REP. Rep fingerprints sharing



**Fig. 1** Dendrogram based on numerical analysis of the 84 concatenated Rep-PCR fingerprints combining ERIC, REP, and (GTG)<sub>n</sub> fingerprints. <sup>a</sup>Name of isolate or type strain. <sup>b</sup>Genotypic affiliation by Rep-PCR, *in bold* Rep-PCR affiliation confirmed by specific PCR. <sup>c</sup>No. of the Rep-PCR group. <sup>d</sup>Nonidentified

more than 40% similarity were grouped together. Rep fingerprints were analyzed as described by Berthier et al. (2001). Briefly, isolates with Rep fingerprints sharing

more than 40% similarity with the Rep fingerprint of a type strain were presumptively affiliated to the species that that strain represented. Dissimilar fingerprints were assumed to be fingerprints of different strains. To avoid the erroneous assessment of two dissimilar fingerprints instead of one, similarity between fingerprints was deduced from both clustering analysis and visual inspection. Fingerprints were assumed to be similar when they had the same bands with the same relative intensity. Dissimilar Rep fingerprints within each Rep group were called fingerprint 1, fingerprint 2, ..., fingerprint  $x$ , revealing genotype 1, genotype 2, ... genotype  $x$ .

## 2.6 Specific PCR

Specific PCR was applied to isolates representative of each Rep-PCR group. The primers used, the microorganisms targeted, the negative and positive controls, and the corresponding references are shown in Table 1.

## 2.7 Phenotypic characterization

### 2.7.1 Identification purpose

The ability of lactococci to produce acid from lactose, glucose, or maltose was assessed in M17-lactose, glucose, or maltose ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) broth incubated at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h in the presence of bromocresol purple ( $0.04 \text{ g.L}^{-1}$ ). The ability of lactococci to grow in the presence of 4% and 6.5% NaCl (gram per kilogram) was tested in M17 broth incubated at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h. The ability of lactococci to grow at  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  was tested with M17 plates incubated for 10 days and 48 h, respectively. Arginine-positive(negative) lactococci were distinguished by their white (yellow) colonies after growth on M16BCP medium (Thomas 1973) at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h.

### 2.7.2 Technological purpose

The ability of lactococci and leuconostocs to acidify at  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , and  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  was tested in 10 mL sterile reconstituted skimmed milk inoculated with  $10^6$  to  $10^7 \text{ cfu. mL}^{-1}$ . pH was recorded after 48 h, i.e., at the end of acidification. The experiment was performed in triplicate, and the three recorded pH values were averaged (the standard deviations ranged from 0.01 U to 0.04 U). Protease-positive lactococci were distinguished by the transparent halo around their colonies after growth at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  on milk agar. Citrate-positive (negative) isolates were distinguished by the blue (white) color of KMK liquid medium (Kempler and McKay 1980) after their growth at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Protease and citrate experiments were performed in triplicate.

## 3 Results

### 3.1 Isolation of strains

Eighty-four Gram-positive and catalase-negative isolates, including 81 cocci, were collected from 79 samples representing 40 farms (Table 2). Of the 84 strains isolated,

**Table 1** Description of specific PCR used in this study

Organisms targeted	Pair of primers used	Targeted genes	Positive controls	Negative controls	References
Genus <i>Enterococcus</i>	Enc38a Reverse of 23	23 S rDNA	<i>E. faecalis</i> <sup>T</sup> <i>E. durans</i> <sup>T</sup> <i>E. hirae</i> <sup>T</sup> <i>E. faecium</i> <sup>T</sup>	<i>L. lactis</i> <sup>T</sup>	Frahm et al. (1998) Berthier and Ehrlich (1998) This work <sup>b</sup>
Species <i>L. plantarum</i>	Lpl 16	16 S/23 S spacer rDNA	<i>L. plantarum</i> <sup>T</sup>	<i>L. paraplantarum</i> <sup>T</sup> <i>L. pentosus</i> <sup>T</sup>	Berthier and Ehrlich (1998)
Subspecies <i>L. lactis lactis</i> <i>L. lactis cremoris</i>	Lhis6R <sup>a</sup> Lhis5F	Histidine biosynthesis operon	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <sup>T</sup> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <sup>T</sup> <i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> <sup>T</sup>		Beimfohr et al. (1997)

<sup>a</sup> Could not distinguish between subspecies *lactis* and *hordniae* of *Lactococcus lactis*

<sup>b</sup> The same PCR conditions as *Lactobacillus plantarum* (Berthier and Ehrlich 1998) were applied

38% were obtained from raw cow's, ewe's, and goat's milks, and 62% from laboratory-fermented ewe's, goat's, mare's, and camel's milks. Among the cocci, 62% were isolated on MRS-vancomycin plates and 38% on M17 plates. From two to 16 isolates (average of nine) were available per medium for each source. The enterococci isolates were collected from both MRS and M17 plates, while the lactococci isolates were collected only from M17 plates and the leuconostocs isolates only from MRS plates, which is usual (Mathot et al. 1994). Enterococci that were isolated on MRS-vancomycin plates originated from fermented milks.

### 3.2 Genotypic characterization

Table 2 summarizes the different genera, (sub)species and genotypes identified among the isolated cocci, according to raw and fermented milks analyzed.

#### 3.2.1 (Sub)species assignment of isolates

Seventy-three percent of the isolates (61 out of 84) were assigned with confidence to seven established mesophilic LAB species or subspecies from four genera, i.e., *Enterococcus* species (41 isolates; *E. hirae* (21), *E. durans* (13), *E. faecalis* (7)), *Leuconostoc* subspecies (six isolates, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (3), *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (3)), *Lactococcus* subspecies (11 isolates, *L. lactis* subsp. *lactis*), and *Lactobacillus* species (three isolates, *L. plantarum*). Nineteen additional isolates were assigned with confidence to *Enterococcus* sp. or *L. mesenteroides*.

Eighty-one isolates formed nine groups (A1, A2, A5, and A7–A12) and three isolates (9, 17, and 76) were alone (A3, A4, and A6, respectively), according to the clustering of their Rep-PCR fingerprints at 40% similarity or higher (Fig. 1). Seventy isolates shared more than 40% similarity with fingerprints for six established LAB (sub)species, *L. mesenteroides*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis*, and *L. plantarum*. The ten isolates of group A10 were related to *E. faecium* and *E. hirae*, but their fingerprints were less than 40% homologous with the fingerprints of either *E. faecium* or *E. hirae*. The *Enterococcus*, *L. plantarum*, and *L. lactis* subsp. *lactis* assignments were confirmed by genus- and (sub)species-specific PCR on 13 isolates representing groups A1 (isolate nos. 2 and 30), A5 (isolate no. 106), and A8–A11 (isolates no. 15, 27, 33, 39, 50, 89, 92, 98, 113, and 137). In so doing, the closely related *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. lactis* subsp. *cremoris* (sub)species were definitively excluded. Six *L. mesenteroides* isolates of group A7 had subsp. *dextranicum* or subsp. *mesenteroides*-type strainlike fingerprints (Fig. 2; fingerprints 1–3). The other nine had a distinct Rep-fingerprint (Fig. 2; fingerprint 4), which presented less similarity to the subspecies-type Rep fingerprints than Rep fingerprints 1–3 of *Leuconostoc* isolates and could not be related to any of the subspecies-type Rep fingerprints. *L. mesenteroides cremoris*-type strain (Fig. 2) had a unique Rep fingerprint. Rep group A9 contained *L. lactis* subsp. *lactis* genotypes (from 11 isolates and the type strain) but not the *L. lactis* subsp. *cremoris*-type genotype, as the *L. lactis* subsp. *lactis*-type strainlike group A obtained from Multilocus Sequence Analysis and (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting (Rademaker et al. 2007).

**Table 2** Occurrence and identity of mesophilic lactic cocci isolated from Algerian raw and fermented milks

Dairy products		Isolates									
Nature <sup>a</sup>	Geographic source	Number of milk/ farm sampled	Number	Medium for isolation	Rep group <sup>b</sup>	Genus <sup>b,c</sup>	Species <sup>b,c</sup>	Subspecies <sup>b,c</sup>	Biovar <sup>d</sup>	Genotype no. <sup>e</sup> (number of isolates)	
Cow's raw milk (RCo)	West Algeria, Tlemcen City	15/6	4	MRS-vancomycin	A7	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>			4 (2)	
				A2, A6	NI				1 (1), 1 (1)		
			11	M17	A9	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis diacephalactis</i>			4 (1)	
				A1	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>			1 (9)		
Goat's raw milk (RG)	West Algeria, Tlemcen City	14/8	7	M17	A11	<i>Enterococcus</i>	<i>hirae faecalis</i>			1 (1)	
				A8	<i>Enterococcus</i>				1 (3)		
			2	MRS-vancomycin	A7	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides dextranicum</i>			2 (2)	
Mare's fermented milk (FM)	West Algeria, Tlemcen City	6/3	10	M17	A9	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis diacephalactis</i>			1 (6), 2 (3), 3 (1)	
			7	MRS-vancomycin	A10	<i>Enterococcus</i>	sp.			1 (6)	
				A3	NI				1 (1)		
Ewe's raw milk (RE)	West Algeria, around Tlemcen	14/6	10	M17	A11	<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>			1 (1), 2 (2)	
				A1	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>			1 (3)		
				A8	<i>Enterococcus</i>	<i>faecali</i>			1 (1)		
Ewe's fermented milk (FE)	West Algeria, Tlemcen City	17/9	12	MRS-vancomycin	A7	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides dextranicum</i>			1 (1)	
				A7	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>			4 (7)		
				A11	<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>			1 (2)		

**Table 2** (continued)

Dairy products		Isolates				
Camel's fermented milk (FCa)	Algerian Sahara,	5/3	13 <sup>f</sup>	A10	<b>Enterococcus</b> sp.	<b>1</b> (1)
	Bechar			A1	<b>Enterococcus</b>	<b>2</b> (1)
	Tamanrasset			A7	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	<b>3</b> (3)
			5	M17	<b>Enterococcus hirae</b>	<b>1</b> (10)
			81 <sup>f</sup>	2	<b>Enterococcus hirae</b>	<b>1</b> (2)
Total		79/40		A8	<b>Enterococcus faecalis</b>	<b>1</b> (3)
				11 <sup>f</sup>	3 <sup>f</sup>	5 established species <sup>f</sup> 3 established subspecies

*Nf* nonidentified

<sup>a</sup> Abbreviated form

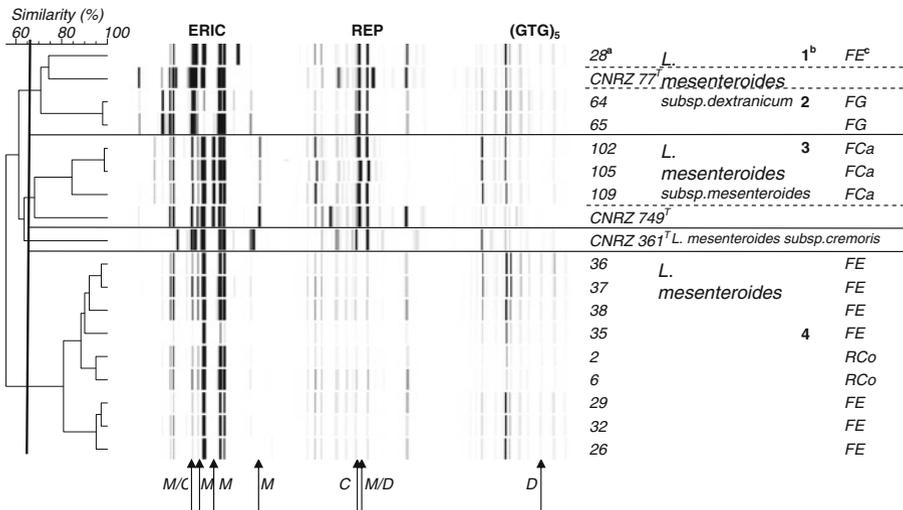
<sup>b</sup> See Fig. 1

<sup>c</sup> Data in bold are as determined by specific PCR

<sup>d</sup> Phenotype on KMK medium

<sup>e</sup> As determined by Rep fingerprinting

<sup>f</sup> In addition, three *Lactobacillus plantarum* isolates (group A5) exhibiting two distinct Rep fingerprints were isolated



**Fig. 2** Dendrogram and Rep fingerprints of *Leuconostoc*. Rep-group=group A7. Clustering was made with concatenated Rep-fingerprints combining ERIC, REP, and (GTG)<sub>5</sub> fingerprints. Solid horizontal lines separate *Leuconostoc* subspecies. Dotted horizontal lines separate dissimilar fingerprints within *Leuconostoc* subspecies. <sup>a</sup>Name of isolate or type strain. <sup>b</sup>Genotypic affiliation by Rep-PCR. <sup>c</sup>See Table 2 for the meaning of RCo, RG, RS, FCa, FE, FG, and FM. Arrows indicate specific bands of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (C), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (D), and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (M) fingerprints

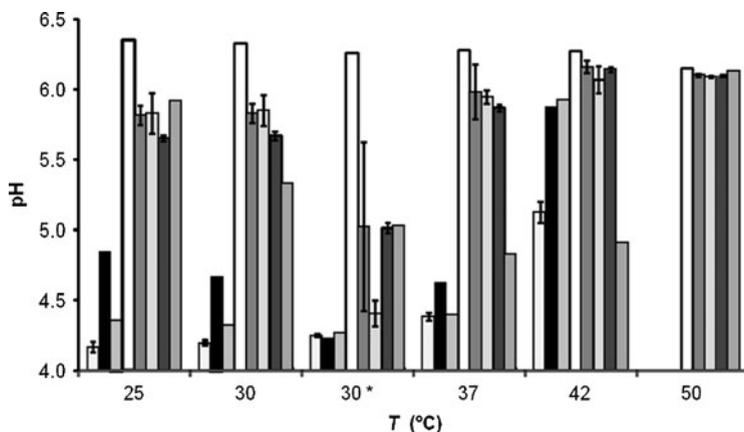
The five groups A2–A4, A6, and A12 (seven isolates) had fingerprints with less than 40% similarity with the type fingerprints shown in Fig. 1. Their DNA responded negatively to the *Enterococcus*-specific PCR. Their fingerprints did not cluster (data not shown) with those of cocci, such as *L. garviae*, *Streptococcus thermophilus*, and *S. gallolyticus*, which are starters for some dairy products. They were not further identified because they were rarely isolated and because they were not affiliated to any of the LAB species previously cited as potential starters.

### 3.2.2 Genotypic diversity within (sub)species

Twenty-one different Rep-PCR fingerprints were distinguished from the 84 isolates according to their clustering. One fingerprint was observed in each of the seven groups A2–A4, A6, A8, A10, and A12; two different fingerprints in each of the three groups A1, A5, and A11 (*E. durans*, *L. plantarum*, and *E. hirae*); and four different fingerprints in groups A9 (*L. lactis* subsp. *lactis*) and A7 (*L. mesenteroides*, Fig. 2), with one in subspecies *mesenteroides* and two in subspecies *dextranicum*.

### 3.3 Phenotype of the isolates

Besides common phenotypic traits, the *L. lactis* and *Leuconostoc* isolates exhibited phenotypic diversity in spite of the small number of isolates analyzed (ten and 15 isolates, respectively). Some phenotypes were atypical. All *L. lactis* isolates grew in the presence of 4.0% NaCl but not 6.5% NaCl and from 10 °C to 40 °C and were



**Fig. 3** Acidification potential of the lactococci and leuconostocs isolates in milk. Sterile reconstituted milks were incubated for 48 h at five different temperatures after inoculation either with one out of the isolates or with one type strain. 30\* milk incubated at 30 °C and supplemented with yeast extract (0.1%). Isolates and type strains affiliated to the same (sub)species and having similar pH values were grouped. Individual pH when isolates or type strains were not grouped ( $N=1$ , standard deviations ranged between 0.01 U and 0.04 U), or mean pH and standard deviation of groups ( $N>1$ ), for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with genotypes 1 or 2 ( $N=9$ ; nine isolates) (light gray); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with genotype 3 ( $N=1$ ; one isolate) (black); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* type strain ( $N=1$ ; CNRZ 142<sup>T</sup>) (gray); noninoculated milk ( $N=1$ ) (white); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ( $N=4$ ; three isolates with *Leuconostoc* genotypes 1 or 2 and CNRZ 77<sup>T</sup>) (gray); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ( $N=4$ , three isolates with *Leuconostoc* genotype 3, and CNRZ 749<sup>T</sup>) (light gray); *Leuconostoc mesenteroides* ( $N=9$ ; nine isolates with *Leuconostoc* genotype 4) (dark gray); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ( $N=1$ ; CNRZ 361<sup>T</sup>) (gray)

protease-, maltose-, galactose-, lactose- arginine-, and citrate-positive, which is typical of the *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* phenotype. Isolate no. 98 (genotype *L. lactis* 3) needed a supplementation of milk with yeast extract to acidify to the same extent than the isolates having genotypes 1 and 2 (Fig. 3). The latter isolates were excellent acidifiers from 25 °C to 37 °C, and still good acidifiers at 42 °C which is an atypical *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype (Fig. 3). In the temperature range of 25 °C to 37 °C, cow's milk was less acidified by leuconostocs isolates than by lactococci isolates, which is usual (Fig. 3). All *Leuconostoc* isolates produced dextran. Absence of dextran production and the lowest pH distinguished the type strain of *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. Contrary to the *Leuconostoc* isolates and type strains of subspecies *mesenteroides* and *dextranicum*, the type strain of *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* showed improving acidification of the milk as the temperature was increased from 25 °C to 37 °C, and still at 42 °C (Fig. 3). However, the type strain had an optimal temperature range of 25 to 30 °C for acidification when incubated in broth as previously described (Cooper and Collins 1978).

KMK liquid medium indicated citrate use for all isolates that coagulated it, i.e., all *E. faecalis* and all *L. lactis*. KMK medium was not coagulated by leuconostocs and other enterococci and indicated a weak citrate use (green color) for *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* type strain and other *Enterococcus* isolates.

## 4 Discussion

In this study, wild strains of leuconostocs (four different strains) and lactococci (four different strains) were isolated from Algerian raw and fermented milks and reliably characterized. Two strains of *L. lactis* subsp. *lactis* and one strain of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* are possible primary starters for the traditional production of Raib and its by-products. They were isolated from camel's and mare's fermented milks, respectively. Enterococci were also unintentionally isolated. The isolates were genotyped, and most strains were reliably identified at the (sub)species level.

The major groups of mesophilic lactic cocci isolated in this study from milks spontaneously fermented in the laboratory are similar to those previously isolated on similar media from their traditionally fermented counterparts (Benkerroum and Tamime 2004). *E. hirae* was the main *Enterococcus* species, which is unusual for dairy products (Foulquie Moreno et al. 2006). Isolates assigned to *Enterococcus* sp. may belong to species *Enterococcus lactis*, as these isolates were genotypically related to *E. faecium*. This species, recently proposed for enterococci isolated from different dairy products (Bauer et al. 2009; Morandi et al. 2011a; Sukhodolets et al. 2005), has been recently validated (Morandi et al. 2011b).

Phenotypic plus genotypic methods distinguished four different strains among 15 *Leuconostoc* isolates. Four genotypes were obtained, genotype 4 having unique phenotypic traits. They were all *L. mesenteroides*, unlike those predominating in Moroccan Lben, which are *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Ouahghiri et al. 2009). Three genotypes were related to the genotype of the type strains of subspecies *mesenteroides* or *dextranicum*. Isolates having these genotypes exhibited the same phenotypic traits as their related subspecies-type strain. The fourth genotype (no. 4), which was shared by nine isolates that produced dextran, clustered with the other *L. mesenteroides* genotypes by Rep-PCR fingerprinting and combined bands characteristic of each *Leuconostoc* subspecies-type fingerprints. The subspecies *mesenteroides* strain isolated from camel's fermented milk could be a useful starter when milk has high levels of nutrients, i.e., ewe's and camel's milks (Abu-Tarboush 1994; Park et al. 2007), as shown by its enhanced acidification of milk in the presence of yeast extract. Lower pH in the presence of yeast extract in milk, especially for the isolates of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, was in accordance with the lower requirements of this subspecies for growth (Garvie 1986). *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* is the unique leuconostoc adjunct available in commercial starters. The *cremoris*-type strain did not produce dextran from sucrose, and was also distinguished by its ability to acidify nonsupplemented cow's milk to (a) lower pH at temperatures from 25 °C to 42 °C and (b) improved acidification as the temperature increased. These last two traits have not yet been described for the subspecies *cremoris*. Atypical metabolic features and ribotype profile, but typical SDS-PAGE profile, have previously been described for the *cremoris*-type strain (Cooper and Collins 1978; Villani et al. 1997). Thermotolerance to 50 °C was recently observed for wild strains of dairy lactococci (Drici et al. 2010) although leuconostocs and lactococci are usually mesophilic bacteria. It would be interesting to explore the link between growth/acidification, thermotolerance, and dextran production observed in this study for leuconostocs. The failure in isolating *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* strains from raw and fermented

milks in this study has already been noticed for raw milk cheeses (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004). Such strains could prove to be useful starters when LAB growth in milk is poor or when the fermentation temperature is above the usual optimal temperature for leuconostocs, 27 °C (Cooper and Collins 1978), as can be the case during the manufacture of Raib. The strains of leuconostocs isolated in this study were probably capable of metabolizing citrate, as is the case for all leuconostocs described so far (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004); they were recorded as citrate-negative on KMK medium because they grew very poorly on it.

Phenotypic plus genotypic methods distinguished four different strains among 11 lactococci isolates. Two of them expressed high acidifying capabilities over a large temperature range of 25 °C to 42 °C. The latter two strains isolated from mare's fermented milks could be useful starters because of their specific phenotype which may be due to the nondairy niche before contaminating milk. They may also exhibit, contrary to lactococci commonly used as dairy starter, fewer amino acid auxotrophies and various additional capabilities such as additional flavor-forming activities and greater stress tolerance (Ayad et al. 1999; Nomura et al. 2006; Smit et al. 2004). These capabilities may be beneficial to milk fermentation and will be interesting to explore. All lactococci isolates exhibited a protease activity, *L. lactis* subsp. *lactis*-like genotypes, and usual *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* phenotype. This subspecies is commonly isolated from Raib by-products (Benkerroum and Tamime 2004).

## 5 Conclusion

Among the eight wild strains of lactococci and leuconostocs collected in this study, two protease-positive *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* strains, *L. lactis* 1 and 2, and the *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain had high acidifying potential in milk. They were isolated from mare's and camel's fermented milks, respectively. These strains can now be tested in the manufacture of Raib. It would be interesting to investigate whether thermophilic homofermentative LAB also play a part in the spontaneous fermentation for Raib. Efficient strain typing is essential for reliable identification of particular strains and tracking of starter cultures, and this study shows that Rep-PCR combining three independent fingerprints is a reliable and discriminating method for leuconostocs, enterococci, and lactococci strains.

**Acknowledgments** The authors thank Romain Palme for his technical assistance and Harriet Coleman for revising the English.

## References

- Abou-Donia S (2008) Origin, history and manufacturing process of Egyptian dairy products. *Alex J Food Sci Technol* 5:51–62
- Abu-Tarboush HM (1994) Growth-behavior of *Lactobacillus acidophilus* and biochemical characteristics and acceptability of acidophilus milk made from camel milk. *Milchwissenschaft* 49:379–382
- Ayad EHE, Verheul A, deJong C, Wouters JTM, Smit G (1999) Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int Dairy J* 9:725–735

- Bauer R, Bekker JP, Nv W, du Toit C, Dicks LMT, Kossmann J (2009) Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *Int J Food Microbiol* 131:260–264
- Beimfohr C, Ludwig W, Schleifer KH (1997) Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *Syst Appl Microbiol* 20:216–221
- Bencharif A (2001) Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: états des lieux et problématiques. *Options Méditerranéennes Série B Etudes et Recherches* 32:25–45
- Benkerroum N, Tamime AY (2004) Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiol* 21:399–413
- Berthier F, Ehrlich SD (1998) Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16 S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett* 161:97–106
- Berthier F, Beuvier E, Dasen A, Grappin R (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int Dairy J* 11:293–305
- Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Beal C (2006) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”. *Int J Food Microbiol* 110:52–61
- Cooper RK, Collins EB (1978) Influences of temperature on growth of *Leuconostoc cremoris*. *J Dairy Sci* 61:1085–1088
- Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D (2010) Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J Appl Microbiol* 108:647–657
- Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106:1–24
- Frahm E, Heiber I, Hoffmann S, Koob C, Meier H, Ludwig W, Amann R, Schleifer KH, Obst U (1998) Application of 23 S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Syst Appl Microbiol* 21:450–453
- Garvie E (1986). Genus *Leuconostoc*. In: Sneath P, Mair J, Sharpe M, Holt J, (eds) *Bergey's manual on systematic bacteriology*, Baltimore
- Gaya P, Babin M, Medina M, Nunez M (1999) Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *J Appl Microbiol* 87:849–855
- Gevers D, Huys G, Swings J (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 205:31–36
- Guizani N, Kasapis S, Al Ruzeiki M (2001) Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk). *Int J Food Sci Technol* 36:199–205
- Hemme D, Foucaud-Scheunemann C (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J* 14:467–494
- Kempler GM, McKay LL (1980) Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl Environ Microbiol* 39:926–927
- Khalidi R, Haddad M, Padilla M (2006) Attentes et attitudes des consommateurs urbains face aux produits laitiers: cas de la commune de Tunis. *Options Méditerranéennes Série A Séminaires Méditerranéens* 78:365–375
- Koussou M, Duteurtre G, Mopota L (2007) Consommation de lait dans les bars laitiers de la ville de N'Djamena au Tchad. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 60:39–44
- Mathot AG, Kihal M, Prevost H, Divies C (1994) Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *Int Dairy J* 4:459–469
- Morandi S, Brasca M, Lodi R (2011a) Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Sci Technol* 91:341–359
- Morandi S, Cremonesi P, Povolo M, Brasca M (2011b) *Enterococcus lactis* sp. nov. from Italian raw milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi:10.1099/ijs.0.030825-0
- Nomura M, Kobayashi M, Narita T, Kimoto-Nira H, Kamoto T (2006) Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J Appl Microbiol* 101:396–405
- Ouadghiri M, Vancanneyt M, Vandamme P, Naser S, Gevers D, Lefebvre K, Swings J, Amar M (2009) Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk ‘Iben’. *J Appl Microbiol* 106:486–495
- Park YW, Juarez M, Ramos M, Haenlein GFW (2007) Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res* 68:88–113
- Prashant TSK, Singh R, Gupta SC, Arora DK, Joshi BK, Kumar D (2009) Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli from churpi cheese. *Dairy Sci Technol* 89:531–540
- Rademaker JLW, Herbet H, Starrenburg MJC, Naser SM, Gevers D, Kelly WJ, Hugenholtz J, Swings J, van Hylckama Vlieg JET (2007) Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 73:7128–7137

- Samet-Bali O, Bellila A, Ayadi MA, Marzouk B, Attia H (2010) A comparison of the physicochemical, microbiological and aromatic composition of traditional and industrial leben in Tunisia. *Int J Dairy Technol* 63:98–104
- Smit BA, Engels WJM, Bruinsma J, Vlieg JETV, Wouters JTM, Smit G (2004) Development of a high throughput screening method to test flavour-forming capabilities of anaerobic micro-organisms. *J Appl Microbiol* 97:306–313
- Sukhodolets V, Botina S, Lysenko A, Trenina M (2005) The lactic acid enterococci *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans*: nucleotide sequence diversity in 16 S rRNA genes. *Microbiology* 74:704–708
- Tantaoui-Elaraki A, El Marrakchi A (1987) Study of Moroccan dairy products: lben and smen. *J Appl Microbiol Biotechnol* 3:211–220
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29:807–813
- Thomas T (1973) Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. *NZ J Dairy Sci Tech* 8:70–71
- Vedamuthu ER (1994) The dairy *Leuconostoc*—use in dairy products. *J Dairy Sci* 77:2725–2737
- Villani F, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S (1997) Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J Appl Microbiol* 82:578–588
- Wolfgang L (2007) Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int J Food Microbiol* 120:225–236