

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'ingénieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Chimie Industrielle

Option : Génie de l'Environnement

**VALORISATION D'UN REJET INDUSTRIEL : CAS DE LA
TRANSFORMATION DU LACTOSERUM EN PRODUITS
D'INTERET ALIMENTAIRE ET TEXTURAL**

Par

BADIS DALILA

Devant le jury composé de :

Z. Benmaamer	Maître de conférences A, USDB	Président
H. Boutoumi	Maître de conférences A, USDB	Examineur
A. Bitam	Maître de conférences A, USDB	Examineur
A. Badis	Maître de conférences A, USDB	Rapporteur

2011-2012

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'ingénieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Chimie Industrielle

Option : Génie de l'Environnement

**VALORISATION D'UN REJET INDUSTRIEL : CAS DE LA
TRANSFORMATION DU LACTOSERUM EN PRODUITS
D'INTERET ALIMENTAIRE ET TEXTURAL**

Par

BADIS DALILA

Devant le jury composé de :

Z. Benmaamer	Maître de conférences A, USDB	Président
H. Boutoumi	Maître de conférences A, USDB	Examineur
A. Bitam	Maître de conférences A, USDB	Examineur
A. Badis	Maître de conférences A, USDB	Rapporteur

2011-2012

RESUME

Seize (16) souches, considérées initialement comme bactéries lactiques sur la base d'un criblage spécifique en utilisant les milieux sélectifs (M17, MRS et Chalmers), ont été isolées à partir des muqueuses des animaux, des surfaces de végétaux et des produits fermentés. L'étude comparative des souches obtenues pour une forte production d'acide lactique a permis de sélectionner la souche 15Vch (M) comme étant la souche la plus acidifiante. L'identification génotypique par la technique 16S indique que cette souche appartient au genre *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch (M).

L'optimisation de la production d'acide lactique sous les conditions suivantes : milieu à base de lactosérum doux non déprotéiné, reconstitué à 10% (P/V) et supplémenté séparément par : Extrait de levure, Corn steep liquor, Tween 80, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄ et KH₂PO₄ + culture en batch à pH 6,37 et incubé à 42 °C, a permis de retenir que la meilleure production est réalisée avec le lactosérum doux supplémenté par **5 g/l** de Corn steep liquor et **0,2 g/l** de KH₂PO₄.

La dernière partie concernant la production d'EPS, nous pouvons dire que la souche épaississante *Streptococcus thermophilus* 1066 est capable de produire une quantité acceptable de ce produit textural en utilisant le lactosérum doux supplémenté avec l'extrait de levure.

Mots clés : Bactéries lactiques - Valorisation - Lactosérum – Acide lactique – Ferments lactiques - *Streptococcus thermophilus* – Exopolysaccharides.

المخلص

سنة عشر (16) عزلة اعتبرت في البداية كبكتيريا الحليب على أساس الفرز الانتقائي باستخدام أوساط زراعية خاصة باصطفاء بكتيريا الحليب أسفرت عليها عملية العزل من الأغشية المخاطية للحيوانات, النباتات , ومن المنتجات المخمرة.

تمت مقارنة كمية إنتاج حمض اللبن عند هذه السلالات, فسمح لنا ذلك بانتقاء السلالة **15Vch(M)** نظرا لإنتاجها أعلى كمية من هذا الحمض.

مكنت الطرق الجينية **Génotypique** بتقنية **ARN 16S** من تصنيف العزلة إ **Lactobacillus plantarum 15Vch(M)**

إيجاد الشروط المثلى لإنتاج حمض اللبن وفق الشروط التالية: وسط الزرع على أساس مصل الجبن الحلو. أعيد إلى

10. والمزود على حدا : مستخلص الخميرة, ماء تنقيع الد **KH₂PO₄, FeSO₄, MnSO₄, MgSO₄, Tween**
6,37 pH درجة الحرارة 42°م, سمح لنا ذلك بالتحصل على أفضل إنتاج في وسط زرع يتكون من مصل الجبن الحلو المزود ب 5غ/ل من ماء تنقيع الدرة و 0,2غ/ل من **KH₂PO₄**

كلمات المفتاحية: بكتيريا الحليب, العزل, مصل الجبن الحلو, إيجاد الشروط المثلى, إنتاج حمض اللبن. السكريات المعقدة.

SUMMARY

Sixteen (16) strain, considered initially as lactic bacteria on the basis of specific sifting by using the selective mediums (M17, MRS and Chalmers), were isolated starting from the mucous membranes from the animals, surfaces of plants and the fermented products. The comparative study of the strains obtained for a strong production of lactic acid made it possible to select the strain 15Vch (M) as being the most acidifying strain. The genotypic identification by the technique 16S indicates that this stock belongs to the genus *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch (M).

The optimization of the production of lactic acid under the following conditions: medium containing soft whey not déprotéiné, reconstituted with 10% (P/V) and separately supplemented by: Extracted from yeast, Corn steep liquor, Tween 80, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄ and KH₂PO₄ + culture in batch with pH 6,37 and incubated with 42 °C, made it possible to retain that the best production is carried out with the soft whey supplemented by 5 g/l of Corn steep liquor and 0,2 g/l of KH₂PO₄.

Key words: Lactic bacteria, isolation, soft whey, optimization, production of lactic acid.

Remerciements

El-Hamdou lillah de nous avoir donné le courage, la patience, la santé et la volonté pour mener à bien ce présent travail.

Mes sincères remerciements sont adressés en premier lieu à mon promoteur M. Badis Abdelmalek qui m'a confié ce thème de recherche et de m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche. Toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable.

En deuxième lieu, je tiens à remercier les membres de jury :

- Monsieur Benmaamer Zobir qui m'a honoré de présider ce jury,
- Messieurs Boutoumi Hocine et Bitam Arezki qui ont accepté de juger ce modeste travail.

Nous tenons à remercier vivement le Docteur Jaouadi Bassem (laboratoire des microorganismes et de biomolécules, centre de biotechnologie de Sfax, Tunisie) pour l'identification génotypique de notre souche de bactéries lactiques.

Egalement, nos remerciements sont adressés à tout le personnel (techniciens et ingénieurs) du département de chimie industrielle ayant contribué efficacement à la réalisation de cette étude.

A tous ceux qui m'ont aidé et que je n'ai pas pu citer, mes chaleureux remerciements.

Dédicaces

A ma famille

A tous mes amis, particulièrement la promotion 2007 de magister,

A mon pays l'Algérie.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: schéma technologique d'obtention des principaux types de sérum issu de la première transformation du lait.....	25
Figure 2: Formes optiques de l'acide lactique.....	28
Figure 3 : Photos montrant les endroits et techniques de prélèvements à partir des animaux.....	38
Figure 4 : Photos montrant les prélèvements à partir des intestins de poulet.....	39
Figure 5: Prélèvements des animaux dilués dans le TSE.....	39
Figure 6: Prélèvements des intestins dilués dans le TSE.....	40
Figure 7: Prélèvements des végétaux (fruit et légumes) dilués dans le TSE.....	40
Figure 8 : Test de présélection de quelque souche sur milieu Chalmers. Montre l'aspect des colonies sur milieu Chalmers. A : halo formé par la souche 15. B : les teintes sur la surface de la colonie de la souche 15. C : halo formé par la souche 38. D : halo formé par la souche	55
Figure 9 : variation de l'acidité du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 24h d'incubation. St 1066 : souche de référence.....	58
Figure 10 : variation de pH du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 24h d'incubation.....	58
Figure 11 : variation de l'acidité du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 48h d'incubation.....	59
Figure 12 : variation de pH du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 48h d'incubation.....	59
Figure 13 : Gel d'agarose (1% TBE/BET) montrant : ADNg de la souche 15chV(M): la quantité d'ADN estimée à 500 ng dans 5 µL de l'ADN extrait à partir de la souche 15. MT : Marqueur de taille.....	62
Figure 14: Gel d'agarose (1% TBE/BET). Taille du gene d'ARN 16S de la souche 15chV(M) est estimée à environs 1,5 kb (piste 1). MT. Marqueur de taille (<i>HincII</i>).....	62

Figure 15 : La morphologie de la souche 15Vch(M) après la coloration de Gram. La culture sur milieu MRS après 24h d'incubation et la forme du germe à Gx100.....	63
Figure 16: La forme d'une souche de <i>Lactobacillus plantarum</i> isolée par Dallaglio et al. (1994). Photographie par microscope électronique à balayage.....	64
Figure 17 : comparaison de l'activité acidifiante de la souche 15Vch(M) dans le LE et le LS. AL : acide lactique.....	64
Figure 18: Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par la poudre du LE en fonction du temps.....	65
Figure 19: Evolution du pH du milieu LS enrichi par la poudre du LE en fonction du temps.....	66
Figure 20 : Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par l'EL en fonction du temps.....	67
Figure 21 : Evolution du pH du milieu LS enrichi par l'EL en fonction du temps.....	67
Figure 22 : Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par CSL en fonction du temps.....	69
Figure 23 : Evolution du pH du milieu LS enrichi par CSL en fonction du temps.....	69
Figure 24: Comparaison de l'évolution de la production d'acide lactique, du pH, de la consommation du lactose et de la biomasse dans un milieu de LS supplémenté par EL (2,5g/l) et un autre par CSL (5g/l) après 24h d'incubation.....	71
Figure 25: Comparaison entre l'effet de EL et CSL en tant que sources d'azote en tenant compte le lactose consommé et la production de la biomasse sèche dans les deux milieux.....	71
Figure 26: Effet de tween 80 sur la production d'acide lactique et la variation du pH.....	73

Figure 27 : Effet des sels minéraux sur la production d'acide lactique dans le LS supplémenté par différentes concentrations des sels minéraux. (S1 : LS+ MgSO ₄ . S2 : LS+ MnSO ₄ . S3 : LS+ FeSO ₄ . S4 : LS+KH ₂ PO ₄ .).....	74
Figure 28 : Effet des sels minéraux sur la variation du pH du LS supplémenté par différentes concentrations des sels minéraux. (S1 : LS+ MgSO ₄ . S2 : LS+ MnSO ₄ . S3 : LS+ FeSO ₄ . S4: LS+KH ₂ PO ₄ .).....	74
Figure 29 : Evolution du pH et de la production d'acide lactique dans les milieux de culture : M1, M2, M3 et M4ensemencés par <i>Lb. plantarum</i> 15 Vch (M) en fonction du temps.....	76
Figure 30 : Variation du pH en fonction de différents milieux utilisés pour la production d'EPS.....	78
Figure 31 : Evolution de la viscosité et du pH en fonction de différents milieux.....	79
Figure 32 : Teneur en EPS en fonction des différents milieux utilisés.....	80
Figure 33 : Evolution de la viscosité et du pH en fonction de lactosérum supplémenté.....	81
Figure 34 : Teneur en EPS en fonction de lactosérum supplémenté.....	81
Figure 35: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.....	(annexe3)
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de lactose.	(annexe3)
Figure 37 : Courbe d'étalonnage de glucose.	(annexe8)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Enzymes du métabolisme de l'oxygène et de ces dérivés.....	9
Tableau 2 : principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments.....	17
Tableau 3 : Composition chimique du lactosérum en (g/l).....	26
Tableau 4 : Emploi de l'acide lactique dans l'industrie.....	31
Tableau 5 : Nombre et endroit de prélèvement à partir des animaux.....	36
Tableau 6 : conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'LE.....	46
Tableau 7 : Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'EL...	47
Tableau 8 : caractéristiques et composition de CSL utilisé.....	47
Tableau 9 : Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de CSL...	48
Tableau 10 : conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de Tween 80.....	49
Tableau 11 : conditions opératoires concernant l'optimisation des concentrations des sels minérales.....	49
Tableau 12 : dénombrement des BL dans les échantillons des animaux.....	53
Tableau 13 : dénombrement des BL dans les échantillons des végétaux et produits fermentés.....	54
Tableau 14 : Tests préliminaires des isolats de BL.....	56
Tableau 15 : Caractérisation morphologique (macro et microscopique) des isolats de BL...	57
Tableau 16 : Résultats de similitude avec les souches de référence.....	61
Tableau 17 : Prix des nutriments utilisés dans les expériences.....	(Annexe 4)
Tableau 18 : Résultat d'isolement et tests de sélection.	(Annexe 5)

Tableau 19 : Critères de différenciation de *Lb.plantarum*.....(annexe 5)

Tableau 20 : Composition de l'extrait de levure.....(annexe 6)

Tableau 21: Composition de corn steep liquor.(annexe 6)

Tableau 22 : Résultats de sélection des souches selon l'acidité et le pH.
.....(annexe 7)

LISTE DES ABREVIATIONS

BL : bactérie lactique.

LE : lait écrémé.

LER : lait écrémé reconstitué.

LS : lactosérum.

AL : acide lactique.

CSL : corn steep liquor (la liqueur de trempe de maïs).

°C: Degré Celsius.

°D : Degré dornic.

% : pourcent.

L(+) : Lévoogyre.

D(-) : Dextrogyre.

pH : potentiel Hydrogène.

GRAS :Generally Recognized As Safe.

I.A.A : industrie agro-alimentaire.

G+C: Guanine + Cytosine.

H₂O₂ : eau oxygénée.

D(-) : dextrogyre.

Cb: carnobacterium.

Lb: Lactobacillus.

Lc : Lactococcus.

P: Pediococcus.

S : *Streptococcus*.

Ln : *Leuconostoc*.

Ec : *Enterococcus*.

MRS: Man Rogosa Sharp.

EPS : Exopolyaccharides.

Pa.s : Pascal.seconde.

INTRODUCTION

Un grand nombre de produits que nous utilisons quotidiennement résulte de l'exploitation des microorganismes d'intérêt industriel dont l'origine remonte à la plus haute antiquité. Le développement de l'industrie de fermentation a donné une preuve éclatante du rôle utile des microorganismes [1].

La production d'acide lactique par voie biologique constitue une alternative très adéquate du procédé chimique qui est souvent responsable de la pollution de l'environnement (émission des gaz à effet serre). A cet effet, les bactéries lactiques (BL) ont occupé une place primordiale dans l'industrie agroalimentaire, pour la fabrication des aliments, produits laitiers, produit carnés, produits de panification, boissons, cidre, vin, etc. [2].

De plus en plus, elles sont employées sous forme de ferments concentrés dans les industries de transformation dont l'une des plus importantes est l'industrie de transformation laitière [2]. Ces bactéries constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire. Elles regroupent des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydases [3], colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau).

Les BL constituent un groupe hétérogène dont le trait commun est la production d'acide lactique qui est un produit industriellement important dû à ses propriétés chimiques souples, utilisé comme additif, acidifiant et conservatif dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, les cuir et textiles, pour la production des produits chimiques et pour la polymérisation en acide polylactique biodégradable [4 ;5]. Actuellement, les BL sont utilisées principalement dans les industries agro-alimentaires pour leur activité acidifiante et épaississante.

L'objectif de notre travail est la valorisation du lactosérum doux par voie microbiologique en utilisant des souches de BL. Pour ce faire, nous avons opté à la démarche scientifique suivante :

(1) le criblage de BL à fort potentiel de production d'acide lactique à partir de différentes niches écologiques locales,

(2) Optimisation d'un milieu de culture à base du lactosérum supplémenté par diverses sources de carbone et d'azote et de sels minéraux pour une meilleure production d'acide lactique peu coûteuse et en utilisant la souche performante sélectionnée,

(3) Production d'exopolysaccharides sur milieu à base du lactosérum doux en utilisant une souche épaississante *Streptococcus thermophilus* 1066.

Le manuscrit ici présenté s'articule sur les parties suivantes :

- Extraction et dosage des polysaccharides "EPS".
- Effet du milieu de culture sur la production des exopolysaccharides sur le lait écrémé et lactosérum doux supplémenté par source d'azote (extrait de levure) et source de carbone (glucose).

LES BACTERIES LACTIQUES

1.1 Généralité

Depuis l'aube de l'humanité, les BL sont employées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains. Malgré leur importance économique, les BL n'ont pas toujours reçu l'attention nécessaire ni de la part des microbiologistes ni de celle des industriels. Depuis quelques années, elles deviennent un sujet d'étude privilégié de part le monde [6].

1.2 Définition et caractéristiques générales des BL

Le groupe des BL ou bactéries d'acide lactique a été défini par ORLA-JENSEN (1919) [7] et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique [2].

Les BL sont des cellules, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes [8]. Peuvent être classées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires.

- Les homofermentaires utilisent la voie de la glycolyse pour produire à partir du glucose deux molécules d'acide lactique.

- Les hétérofermentaires, en utilisant la voie de 6- phosphogluconate, fermentent les hexoses pour former l'acide lactique, le CO₂ et l'éthanol (ou l'acide l'acétique) comme produits finaux [9].

La différence entre ces deux groupes est détectable par dégagement de CO₂. Certaines BL homofermentaires, sous certaines conditions, c'est-à-dire dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétérofermentaires facultatives [10].

Les BL présentent d'autres caractéristiques communes qui peuvent expliquer leur regroupement [6] :

- Ce sont des cocci ou des bâtonnets [11], à gram positif, généralement immobiles, asporulées et de ne posséder ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate réductase [12].

- Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire : incapable de synthétiser le noyau hème des porphyrines, elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptes à toutes respirations aérobies ou anaérobies [6].

- Ce sont en générale aérotolérantes. Cependant, certaines espèces, sont anaérobies strictes [11], elles colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale [13].

Du point de vue phylogénétique, les BL appartiennent à la branche Clostridiale des bactéries Gram positives, avec un G+C % inférieur à 55%. La taxonomie actuelle regroupe les principaux genres de BL en fonction de leur parenté phylogénétique : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, d'une part et *Streptococcus* (espèce *Thermophilus*), *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, d'autre part [14].

Le genre *Bifidobacterium* appartenant à la branche « Actinomyces » est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme un genre de BL [15 ; 2] bien qu'il se distingue par un G+C% de 55 %, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière [3].

Toutefois, des exceptions ont été observées concernant la production d'endospores et la mobilité de quelques souches de lactobacilles, l'aérobiose de certains streptocoques et les lactobacilles, la présence de réaction catalase positive chez les pediocoques et chez quelques lactobacilles [8].

1.3 Caractéristiques et habitats des différents genres

1.3.1 Genre *Lactobacillus*

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du G+C% 32 à 53% [16]. Représentent certainement le groupe des BL les plus ubiquitaires qui colonisent tous les habitats contenant des glucides fermentescibles, des produits d'hydrolyse des protéines, des vitamines, des facteurs de croissance et une basse tension d'oxygène [12].

Ce sont des bacilles acidotolérants, dont de nombreuses espèces sont impliquées dans des fermentations alimentaires [17]. Les isomères de l'acide lactique produit sont, selon les souches, DL, L(+) ou D(-). En outre, ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes, variables d'une espèce à l'autre et un large spectre de températures de croissance (2 à 53 °C). L'espèce type est *Lactobacillus delbruekii* [18].

- **Subdivisions du genre *Lactobacillus***

Le genre *Lactobacillus* a été divisé dès 1919 par ORLA-JENSEN en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*, suivant des critères de température optimale de croissance et de produit de la fermentation des sucres. Néanmoins, les travaux de taxonomie moléculaire ont incité Kandler et Weiss (1986a) [19] à abandonner la classification en sous-genres tout en maintenant la subdivision en trois groupes désignés par des numéros [18]:

- **Groupe I** : formé de lactobacilles homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses par la voies d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement de lactate, mais ne fermentent ni les pentoses, ni le gluconate.

- **Groupe II** : formé de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, par la voies d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement de lactate (ou, tout au moins pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate, en présence de quantités limitantes de glucose) et peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible.

- **Groupe III** : formé de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO₂ et qui fermentent les pentoses en lactate et acétate en faisant appel dans les deux cas à une phosphokétolase.

Les espèces mésophiles, caractérisées par un large spectre de fermentation sont présentes dans le lait, les fromages [20], les laits fermentés [21], les végétaux fermentés, le vin, la duit de panification [22], les viandes fraîches ou fermentées, les saucissons et le tube digestif de l'homme et de l'animal [20]. La présence des espèces thermophiles, à spectre étroit de fermentation, est beaucoup plus limitée aux laits fermentés, au yaourt et certains fromages fabriqués à une température supérieure à 40 °C [20 ; 23].

1.3.2. Genre *Carnobacterium*

Des études menées sur les produits carnés ont conduit à isoler des BL décrites comme des *Lactobacillus* atypiques, peu acidifiants. Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre, *Carnobacterium*. Morphologiquement proches des *Lactobacillus*, ils sont différenciés par leur tendance psychrotrophe et leur production majoritaire de l'isomère L de l'acide lactique [17].

Les espèces appartenant à ce genre ont des cellules en forme de petits bâtonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes. Sur les six souches connues trois sont mobiles : *Cb. mobilis*, *Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum*. Elles se développent bien à 10 °C, quelques souches à 0 °C, aucune à 45 °C ni en présence de 8% de NaCl. Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% [12].

Sont isolées aussi de produits de la mer, le plus souvent conditionnés sous atmosphère modifiée, mais également du contenu intestinal ou du tissu rénal de salmonidés [16]. L'espèce type est *Carnobacterium divergens* [12].

1.3.3. Genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Vagococcus*

Ils rassemblent les coques homofermentaires, produisant en majorité de l'acide L-lactique. Les espèces initialement regroupées dans le genre *Streptococcus* ont été redistribuées au sein de ces genres selon les homologies de leurs ARN ribosomiques 16S [24].

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ils sont mésophiles, se développent à 10 °C et non à 45 °C. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers [3]. Et aussi isolés de la peau des animaux. L'espèce type est : *Lactococcus lactis* [18].

Le genre *Streptococcus* : Ayant pour principales caractéristiques la présence, dans leur enveloppe, d'antigène spécifique était d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupe sérologique de LANCEFIELD (1933) [12]. Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *St. pyogenes* et *S. agalactiae* ; d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*St. mutans*) [25].

L'espèce thermophile, *St. thermophilus* se différencie par son habitat, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique [25], elle se distingue essentiellement avec un

optimum de croissance autour de 42 à 43 °C, l'absence de tout antigène de groupe, sa thermorésistance à 60 °C (parfois 65 °C) pendant 30 minutes [26], une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et forte sensibilité au NaCl [27]. Elle peut être isolée à partir du lait chauffé à 50–54 °C, du lait pasteurisé [28], des produits laitiers (yaourt), du matériel de laiterie et des levains artisanaux [29].

Certaines espèces de *Lactococcus*, et *Streptococcus* isolées de poissons et d'eau douce et qui possèdent la particularité d'être mobiles, ont été répertoriées dans le nouveau genre *Vagococcus* [3]. Les bactéries de ce dernier genre (*Vagococcus*) ont des cellules de forme ovoïdale capable de se développer à 5 et 10 °C et en présence de 4% de NaCl, mais aucune ne réussit à pousser à 45 °C, en présence de 6,5% de NaCl, à pH 9,6 ou à survivre après un traitement à 60 °C pendant 30 minutes. Leur métabolisme est homofermentaire et elles produisent avec le glucose, de façon quasi exclusive, de l'acide lactique L(+). Leur contenu G+C de 33 à 37% est proche de celui de l'espèce *Lc. lactis*, généralement présents dans les excréments de poulets, dans les eaux de fleuve ou chez des truites malades. L'espèce type est *Vagococcus fluvialis*. [12].

Le genre *Enterococcus* : rassemble la plupart des espèces de groupe sérologique D et comprend notamment les espèces anciennement désignées sous le terme "streptocoques fécaux" comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils se caractérisent par leur développement à 14 et 45 °C, leur aptitude à croître en présence de 6,5% de NaCl, et à pH 9.6, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers [25]. L'espèce type est l'*Enterococcus faecalis*. [12].

1.3.4. Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrades, qui les différencie des genres précédents. Ils sont mésophiles [25]. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+). Leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et chez la plus part des espèces leur incapacité d'utiliser le lactose ne leur permettent pas de coaguler le lait [30]. Ils sont présents dans les végétaux en décomposition, parfois dans la bière, le cidre et le vin mais peuvent être trouvés aussi dans le lait et les produits laitiers [31 ; 32] et dans les préparations d'anchois [33].

Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme *P. halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolèrent jusqu'à 18% de NaCl [16], elle se rencontre dans les saumures et les harengs salés [18].

1.3.5. Genre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate, ce qui leur confère une activité aromatique, importante. D'autres synthétisent des dextrans en présence de saccharose [34]. Les *Leuconostoc* représentent la partie dominante de la microflore lactique des végétaux frais. Apparemment, leur habitat principal est la surface des feuilles, les grains, les zones abritées des entre-nœuds, les grains de raisin, les inflorescences [18].

L'espèce *Leuconostoc oenos* a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* [35] et certain lactobacilles hétérofermentaires ont été groupés avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* [14].

1.3.6. Genre *Bifidobacterium*

Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes, coccoïdales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposées en V ou en palissade (Bourgeois et Larpent, 1996). Elles se différencient des autres BL par leur caractère anaérobie, leur G+C% élevé, et présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase [36].

Découverts dans les selles d'enfants nouveau-nés, on peut les isoler de l'intestin, du vagin ou de la bouche des adultes. On les retrouve aussi dans le tractus intestinal de nombreuses espèces animales. La présence ou prédominance de telle ou telle espèce dans l'intestin des nouveau-nés humains est controversée [36 ; 37].

1.4 Les influences sur le métabolisme

1.4.1. La température

De même que pour les réactions chimiques ordinaires, la vitesse de réaction enzymatique est fonction de température [38]. Dans l'industrie laitière, les températures extrêmes d'activité des BL varient de 5 à 55 °C tandis que les températures optimales sont

comprises entre 20 et 45 °C [8]. Il faut noter que l'activité métabolique dépendra aussi de la composition du milieu de culture [39].

1.4.2. L'oxygène

En générale, les BL sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O₂) en superoxyde, en peroxyde ou en eau. Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder [40 ; 41].

L'ensemble des enzymes et des réactions catalysées est donné dans le tableau 1. Ces enzymes ont été reconnues chez les souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* [41].

Tableau 1.14.2 : Enzymes du métabolisme de l'oxygène et de ces dérivés [41].

1.NADH :H ₂ O ₂ oxydase :	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$
2.NADH :H ₂ O oxydase :	$2 \text{NADH} + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$
3. Pyruvate oxydase (+ TPP, FAD):	$\text{Pyruvate} + \text{phosphate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{acétylphosphate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
4. α-glycérophosphate oxydase:	$\alpha\text{-glycérophosphate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{dihydroxyacétone phosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$
5.Superoxydase dismutase:	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
6.NADH peroxydase:	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}$

TPP: thiamine pyrophosphate; FAD: flavine adenine dinucléotide.

La production de certains dérivés de l'oxygène moléculaire par certaines BL est reconnue depuis longtemps : en présence d'air, le peroxyde, s'il n'est pas détruit par une peroxydase, peut s'accumuler, et autoinhiber la souche productrice mais surtout inhiber des souches concurrentes [40]. L'inhibition par le peroxyde peut être amplifiée dans le lait par la présence de lactoperoxydase et de thiocyanate : l'hypothiocyanite produit étant toxique [42].

1.4.3. pH du milieu de culture

Les bactéries du groupe lactique ont des pH optimaux de croissance respectivement de 5,5-6,2 chez *Lactobacillus*, de 5,5-6,5 chez *Pediococcus*, de 6,3-6,5 chez *Lactococcus* et *Leuconostoc* et de 7,0 chez *Enterococcus* et des pH finaux d'acidification respectivement de 3,2 à 3,5 chez *Lactobacillus*, de 3,5 à 4,4 chez *Pediococcus*, de 4,0 à 4,5 chez *Lactococcus*, de 4,2 à 4,6 chez *Enterococcus* et de 5,0 chez *Leuconostoc* (31; 27; 43 ; 44].

1.5. Métabolisme des BL

1.5.1. Métabolisme du lactose

La fermentation des sucres par les BL aboutit principalement à la production d'ATP et d'acide lactique. Pour ces bactéries, la fonction prioritaire du métabolisme est de produire l'énergie (ATP) nécessaire à leur croissance et à leur reproduction tandis que l'acide lactique constitue un déchet toxique, qui en s'accumulant dans le milieu, ralentit le métabolisme jusqu'à l'arrêt complètement.

En technologie laitière, au contraire, la principale fonction des BL est de transformer le lactose du lait en acide lactique qui intervient à différents stades des fabrications : participe à la coagulation du lait, provoque la déminéralisation et l'égouttage du caillé et agit sur le goût et sur la conservation des produits laitiers fermentés.

Le métabolisme du lactose par les BL s'opère en trois phases :

- le transport à travers la membrane ;
- le clivage du disaccharide en ces composants ;
- et la dégradation des monosaccharides par des voies métaboliques différentes selon l'espèce bactérienne [45].

1.5.2. Citrate

Le citrate seul ne peut être utilisé comme substrat de croissance par les BL. Par contre en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote, certaines BL : *Lc. lactis*, *subsp. lactis biovar diacetylactis*, certains *Leuconostoc* (*Ln. Lactis*, *Ln. cremoris*), certains *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*), certains *Streptococcus* comme *S. thermophilus* et certains *Enterococcus* comme *Ec. Faecium* peuvent utiliser le citrate du lait.

La voie métabolique d'utilisation du citrate est identique chez ces différentes bactéries. Elle aboutit à la formation d'acétate (en majeure partie excrété), de CO₂ et de diacétyl (2,3-butanadione) qui sont les composés aromatisants; d'autres produits sont excrétés : l'acétoïne et éventuellement le 2,3-butylène-glycol [2].

1.5.3. Dextranes

Certaines BL synthétisent des exopolysaccharides (polysaccharides exocellulaires ou polysaccharides capsulaires) de taille et de structure variables (insolubles et linéaires ou solubles et ramifiés) de grande importance industrielle [46].

Certaines sous espèces de *Ln. mesenteroïdes* (*mesenteroïdes* et *dextranicum*) produisent, à partir du saccharose sous l'action d'une glucosyltransférane "dextrane-sucrase" inductible et exocellulaire, des dextranes (homopolymères de glucose) [47] dont la sécrétion est maximale à pH 5,8 à 7,0 [48]. Cette enzyme catalyse le transfert de résidus glucosyl vers le polymère de dextrane à partir du saccharose avec libération de fructose [46].

Chez les leuconostocs, une grande quantité de saccharose du milieu est converti en dextrane et fructose par la dextran-sucrase, à l'extérieur de la cellule. Le reste du saccharose pénètre dans la cellule où il est phosphorylé par une phosphorylase sucrase (inductible) et transformé en glucose 6-phosphate par une phosphoglucomutase avec formation de lactate, d'acétate et d'éthanol [49].

1.5.4. Activité protéolytique

Après l'utilisation des acides aminés et des peptides libres, les bactéries doivent, pour leur croître dans le lait, hydrolyser les protéines et les oligopeptides. A cause de leur charge et de leur taille, ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique des bactéries : leur hydrolyse nécessite la présence de protéases et de peptidases bactériennes extracellulaires ou liées à l'enveloppe bactérienne [6].

Selon Novel, (1993) [2], le système protéolytique des BL est constitué de deux types d'enzymes distinctes :

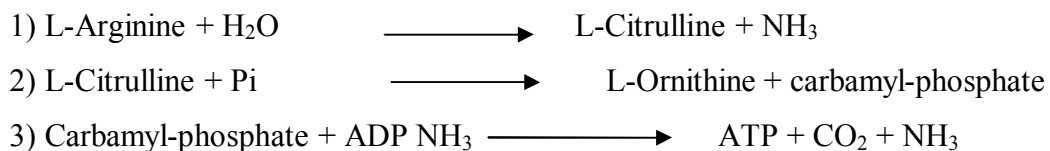
- les protéases capables d'hydrolyser des protéines natives par exemple les caséines ou leur dérivés.
- les peptidases détectées par l'hydrolyse de peptides issus de la dégradation des protéines.

Cette dégradation joue un rôle crucial dans le développement de la texture et de la flaveur des produits laitiers [50].

1.5.5. Acides aminés

Les acides aminés sont utilisés pour la croissance par de nombreux microorganismes. Peu d'études ont été réalisées sur leur catabolisme par les BL. Les microorganismes catabolisent l'arginine selon au moins six voies, chez les BL cet acide aminé est dégradé par le système de l'arginine désiminase (parfois appelé arginine dihydrolase) [51].

Ce système est en fait formé de trois enzymes agissant successivement : la L-Arginine désiminase (ADI, première réaction), l'Ornithine carbamoyl-transférase (OTCase, deuxième réaction) et la carbamate kinase (CK, troisième réaction) [6], selon les réactions suivantes [52] :



Chez les lactobacilles, le catabolisme de l'arginine est fréquent, particulièrement dans le groupe III et généralement absent dans le groupe I et II [2]. Contrairement, les deux espèces *Lc. lactis* subsp. *lactis* (et son biovar *diacetylactis*) et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* n'hydrolysent pas l'arginine. Chez *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, l'arginine est toujours absente et l'octase ne l'est que chez certaines souches seulement [53].

L'arginine est aussi utilisée selon la voie de l'arginine désiminase chez *Ec. faecalis* [54], *Ec. faecium* et *S. sanguis* [55]. Chez *S. thermophilus*, l'existence de ce métabolisme reste controversée : pour certains cette espèce est arginine-négative. Certaines souches seraient arginine-positives [56] mais leur appartenance taxonomique à l'espèce n'a pas été démontrée [2].

1.6. Exigences nutritionnelles des BL

Les BL ont une faible aptitude biosynthétique et sont, en principe, incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de l'environnement terrestre. Elles sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnel, c'est parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissances comme les vitamines et les cations [38].

1.6.1. Exigences en acides aminés

Les BL sont en principe incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme [45]. Par exemple leur croissance dans le lait est limitée par sa trop faible concentration en acides aminés libres et par l'absence de certains acides aminés comme la méthionine [39]. Selon Mills et Thomas (1981) [50], par marquage au ^{14}C des acides aminés libres du lait constituaient la source d'azote la plus rapidement incorporée dans les protéines cellulaires de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* mais la croissance obtenue reste limitée : 5% de la population cellulaire totale dans du lait pasteurisé [57] et 25% dans un lait autoclavé [58; 50].

1.6.2. Exigences en vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme et que les BL sont, à quelques exceptions près, incapables de les synthétiser.

Les lactocoques exigent un certain nombre de vitamines, en particulier l'acide nicotinique (B3), l'acide pantothénique (B5) et sans doute la biotine (B8) [59 ; 39]. La pyridoxine (B6) est stimulante mais l'acide aminé L-alanine peut la remplacer pour certaines souches [38].

St. thermophilus a une exigence absolue en acide pantothénique (B5) et en riboflavine (B2) et à un moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8). Pyridoxine ou ces dérivés (B6) stimule fortement sa croissance [60].

Les besoins vitaminiques des lactobacilles sont plus complexes. Toutes les espèces ont un besoin absolu en pantothénate de calcium (B5) et en niacine (B3) et des exigences différentes pour les autres vitamines. D'autre part, les déficiences en cobalamine (B12) peuvent induire une diminution de la synthèse d'ADN et entraîner des changements morphologiques, les

cellules devenant filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a aussi été rapportée pour *Lb. Helveticus ssp jugurti* lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique (Bc).

Il apparaît clairement que plusieurs vitamines du groupe B sont essentielles au métabolisme de l'ensemble des BL [38].

1.6.3. Exigences en bases azotées

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des BL, excepté pour *Ln.mesenteroides ssp.cremoris* [38] et pour *St. thermophilus* [61].

La production d'acide par *Lc.Lactis* C10, peut être stimulée, notamment dans le lait, par le mélange adénine, guanine, uracile et xanthine [62].

Certaines souches de *Lc. lactis ssp. lactis* et de *Lb. casei* peuvent être aussi stimulées par le mélange hypoxanthine + adénine [63]. D'après Ledesma et al. (1977) [64], dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile à une concentration de 0,05 g/l.

En général, pour les lactobacilles les exigences en base azotées sont très variables selon les espèces [38].

1.6.4. Exigence en cations

Mis à part les rapports sur le rôle précis des cations dans la résistance à l'oxygène ou dans les différentes réactions métaboliques, peu d'études ont été consacrées au rôle global des métaux dans la nutrition des BL. Il a été montré cependant que les ions Fe^{+3} , Mg^{+2} , Mo^{+4} et Se^{+4} pouvaient intervenir dans la nutrition des streptocoques mésophiles [42 ; 65] et les ions Mg^{+2} et Mn^{+2} [66] et Fe^{+2} [67] dans la nutrition des lactobacilles. D'autre part, il semblerait aussi que le cuivre puisse avoir un effet sur la morphologie des BL cultivant dans le lait [68].

2. Les ferments lactiques

2.1. Découverte des ferments

Bien avant que l'on soit conscient de l'existence des BL, elles étaient largement employées dans la conservation des aliments à base de lait, de viande, de poisson, de légumes et de fruits. C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème}

siècle que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Storch (1890) au Danemark, Conn (1889) aux USA, et Weigmann (1896) en Allemagne ont conclu à la présence de bactéries responsables de l'acidification du lait et de la maturation de la crème ; Von Freudenreich *et al.* (1897) sont parvenus à isoler un streptocoque responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème. Orla Jensen en 1919, a publié, une remarquable monographie qui représentait, à l'époque, une avance considérable dans la connaissance des différentes espèces de BL. L'étude et la sélection de ces bactéries allaient pouvoir se développer en vue d'améliorer la qualité et la régularité des produits fermentés. C'est dans le domaine laitier que les principaux progrès ont été réalisés en matière de ferments [69].

2.2. Composition des ferments

On doit d'emblée souligner la dualité qui existe entre les ferments lactiques naturels et les ferments lactiques sélectionnés [69].

2.2.1. Les ferments lactiques naturels

Ils proviennent de laits n'ayant subi aucun traitement thermique et sont de composition complexe et variable selon le terroir d'où ils proviennent. On peut distinguer les ferments thermophiles et mésophiles [38] :

- **Les ferments naturels thermophiles**

Ils sont utilisés pour la fabrication des fromages à pâte cuite [70]. Ceux de type "Recuites", sont élaborés par macérations de caillettes de veaux dans du lactosérum désalbuminé par chauffage et représentent, à la fois, la source d'enzymes coagulantes et la flore lactique [69].

La flore lactique n'est pas sélectionnée et comporte de ce fait plusieurs espèces de lactobacilles (*Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* et à un degré moindre, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lb. acidophilus*), des streptocoques (*S. thermophilus*) et parfois des espèces du genre *Enterococcus* [70].

- **Les ferments naturels mésophiles**

Ils sont utilisés pour la fabrication du beurre et de nombreuses variétés de fromages.

Ils contiennent des bactéries acidifiantes auxquelles sont souvent associées des bactéries aromatisantes permettant de distinguer quatre types de ferments pour l'industrie laitière [69] :

- Les ferments N ou O qui ne contiennent qu'une flore acidifiante formée de *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *cremoris*.
- Les ferments B ou L qui contiennent uniquement des espèces de *Leuconostoc* productrices d'arômes.
- Les ferments D qui contiennent uniquement *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* producteurs d'arômes.
- Les ferments BD (ou LD) qui contiennent à la fois des souches de *Leuconostoc* et de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

2.2.2. Les ferments sélectionnés

Ils sont composés d'une souche pure ou un mélange de souches pures. Définie comme une population formée à partir d'une colonie isolée et développée sur un milieu de culture gélosé.

La sélection des souches, préoccupation majeure, est basée sur les propriétés acidifiantes, aromatisantes, épaississantes, gazogènes et surtout le critère déterminant relatif à leur comportement vis-à-vis des phages, mis en évidence par Whitehead et Cox (1935) pour les phages des lactocoques (ferment lactique mésophile) utilisé pour la fabrication du Cheddar [38].

2.3. Contexte législatif de l'utilisation des BL

L'utilisation des BL dans les produits fermentés est très ancienne et ces produits ont une image plutôt positive auprès des consommateurs ; ils ont de plus prouvé leur innocuité à travers de leur consommation. Du fait de cette ancienneté, les BL, sont généralement considérées non pathogènes et leur ajout dans les aliments n'est pas soumis à une réglementation stricte comme peut l'être celle des additifs. Cependant, le développement croissant de produits enrichis en BL probiotique, et celui plus récent de la biopréservation posent la question de l'ajout dans les produits alimentaires de BL qui ne sont pas traditionnellement utilisées dans les produits fermentés. La problématique de l'antibiorésistance de souche d'*Enterococcus* utilisées dans les aliments est notamment soulevée [17].

2.4. Action des bactéries lactiques dans les aliments

Les BL ont deux rôles principaux dans les aliments, liés à leurs activités métaboliques (**Tableau 2**) [25] :

- Un rôle positif ou technologique : il s'exerce principalement dans les produits fermentés avec des conséquences sur l'ensemble des facteurs de qualité.
- Un rôle négatif : il se traduit essentiellement par l'altération des denrées concernées, qu'elles soient ou non fermentées.

Tableau 2.2.4 : principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments [25].

Rôles positifs	Rôles négatifs
Structure et texture Arômes et saveur Conservation Nutrition	Altération de l'aspect Altération des qualités organoleptiques Production de composés toxiques

2.4.1. Propriétés technologiques

La plupart des aliments fermentés font intervenir des BL soit en tant qu'agent principal de la fermentation, soit en tant qu'agent secondaire. Dans ces produits le rôle principal des BL est l'acidification qui participe à la saveur et à la texture des produits mais elles exercent au travers de leur métabolisme d'autres rôles sur les caractéristiques organoleptiques et technologiques des aliments fermentés ou non [17].

2.4.1.1. Rôle sur la structure et la texture

Dans les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé plus ou moins ferme selon les BL présentes. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourts brassés, lait ribot, kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée, l'utilisation de souches plus ou moins acidifiantes peut être combinée à celle de souches productrices de polysaccharides.

En ce qui concerne les fromages, le rôle des BL est la formation d'un caillé dit "lactique". Il est plus ou moins associé à une coagulation par la présure [16].

2.4.1.2. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques

En dehors de l'acide lactique et des autres acides organiques produits par fermentation qui confèrent aux produits leur caractère acide, les principaux composés impliqués sont le diacétyl et l'acétaldéhyde, responsables notamment des saveurs caractéristiques [25].

2.4.1.3. Rôle sur la conservation

L'une des principales caractéristiques des produits fermentés est leur stabilité par rapport à la matière première dont ils sont issus. Ce rôle sur la conservation des produits est lié à la présence quantitative des BL dans les produits fermentés où elles dépassent généralement 10^6 bactéries/gramme d'aliment, exerçant ainsi un phénomène de compétition vis-à-vis des autres flores. A ce mécanisme, s'ajoutent les propriétés spécifiques d'inhibition des BL qui s'exercent de différentes manières [17] :

- **Production d'acide :** le métabolisme principal des BL a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Le pH final dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est le plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yaourts, 4,8 pour la choucroute, 4,6 et 5,3 dans le cas des saucissons. A ces valeurs de pH le développement de la plupart des flores d'altération et des flores pathogènes est inhibé ce qui participe à la stabilité des produits fermentés [17].
- **Production de bactériocines :** ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de BL. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif [16].

La production de bactériocines est une propriété très courante chez les BL utilisées comme ferments ou présentes naturellement dans les aliments. A ce titre, elles ne sont pas assimilables à des antibiotiques dont elles se distinguent par plusieurs propriétés : synthèse par voie ribosomale, spectre d'activité étroit, sensibilité aux enzymes protéolytiques [17].

- **Production d'autres substances inhibitrices :** le peroxyde d'hydrogène ou les dérivés de l'oxygène produits par les BL peuvent exercer un effet inhibiteur sur certaines flores d'altération. Le diacétyl, produit du métabolisme du citrate est capable d'inhiber des bactéries à Gram négatif. Tous ces composés agissent

probablement en synergie avec les précédents et les facteurs des milieux pour conduire à des produits microbiologiquement stables [16].

2.4.2. Les BL et biopréservation

La notion de biopréservation s'est développée à partir de la connaissance de ces propriétés d'inhibition des BL. Elle consiste à utiliser des BL, et/ou leur métabolites dans des denrées alimentaires dans le but de prolonger leur durée de vie. Les applications potentielles concernent essentiellement des produits carnés ou des produits de la mer, produits où les BL ne réalisent pas de fermentation, mais elles sont naturellement présentes du fait de caractéristiques physico-chimiques favorables : faible pH, salinité élevée, absence d'oxygène [17].

2.4.3. Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des BL

De nombreuses traditions rapportent les effets bénéfiques pour la santé de la consommation de produits laitiers fermentés. Actuellement des équipes scientifiques étudient dans plusieurs pays et sous divers aspects les hypothèses suggérées par ces traditions. Leur travail de plus en plus nombreux conforte des hypothèses, rapportent des effets observés *in vitro* et sur des animaux, et, depuis quelques années, apportent des démonstrations nettes de l'effet des produits laitiers fermentés et de leurs bactéries vivantes sur la santé de l'homme [71].

Pour avoir un rôle bénéfique sur la santé humaine, les BL doivent garder une certaine activité, voire une viabilité lors du transit intestinal. Les bactéries elles-mêmes, ou les enzymes doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires [53].

Les effets observés sur l'homme après ingestion des BL seules ou sous forme de produits laitiers fermentés sont résumés comme suit :

- Activité hypocholestérolémiante ;
- Action anticarcinogène et activation du système immunitaire ;
- Amélioration de la digestion du lactose ;

- Inactivation des composés toxiques ;
- Protection contre les infections intestinales.

2.4.4. Rôle dans l'altération

Dans toutes les denrées où la flore lactique est présente, son activité métabolique peut également se manifester par des effets négatifs sur la qualité des aliments du fait des altérations provoquées par la production de métabolites comme [3]:

- Polysaccharides ;
- Gaz ;
- Peroxyde d'hydrogène ;
- Composés aromatiques ;
- Amines biogènes ;
- L'acide lactique et d'autres acides organiques :

Les altérations se manifestent dans le lait cru, en cas de maintien à température ambiante ou rupture de la chaîne du froid. Le développement de la flore lactique sauvage et l'acidification non contrôlée qui s'ensuit entraînent une altération irréversible du produit. Il faut noter également qu'une acidification trop marquée est nuisible à l'affinage de certains fromages et à la qualité des yaourts par exemple.

L'acidification trop poussée, ou non contrôlée, est également à l'origine de l'altération des produits carnés conservés sous vide ou saumurés, avec le développement de goûts et d'odeur acides, et d'accidents de fabrication lors de la production du saucisson sec (acidité prépondérante aux dépens des autres saveurs du produit) [3].

Enfin, le phénomène de "piqûre lactique" est une cause bien connue et courante des accidents de vinification. Elle est provoquée par un démarrage trop rapide de l'activité des BL, avant la transformation quasi-totale des sucres en alcool. Les quantités résiduelles importantes de sucres sont alors transformées en acide lactique et acétique, conduisant à une augmentation de l'acidité totale et volatile du vin [12].

2.5. Risques d'infections en santé publique

Les BL ont été incriminées dans des cas d'endocardites, de bactériémies ou de septicémies et d'infections locales. Ces infections sont extrêmement rares et

surviennent quasiment toujours dans un contexte clinique et non pas toxi-infections alimentaires. Les quelques cas d'infections à BL, commensales de l'homme, ont particulièrement permis de « tirer la sonnette d'alarme » sur leur utilisation massive dans l'industrie alimentaire [53].

LACTOSERUM

3. Lactosérum

Malgré la situation nutritionnelle et économique actuelle, en particulier dans le secteur de lait et dérivés, nous assistons à des rejets énormes du lactosérum par les industries fromagères. Elles génèrent plus de 145 millions de tonnes de lactosérum liquide par année [72]. Ces rejets constituent une menace réelle pour l'environnement car le lactosérum est riche en matière organique, en particulier, le lactose à 40% [73]. L'implantation de porcheries à proximité des fromageries présentait des inconvénients sur le plan hygiénique et ne réglait qu'en partie le problème de pollution. Si le sérum était mis à l'égout, la pollution d'une fromagerie rejetant 50000 litres de sérum serait équivalente à celle d'une ville de 25000 habitants [74]. Dans ces conditions, il est devenu indispensable de le recycler pour éviter la menace polluante. Encore faut il que son traitement soit économiquement acceptable.

3.1. Définition et caractéristiques du lactosérum

Le lactosérum ou simplement sérum est la phase aqueuse qui se sépare du caillé lors de la fabrication des fromages ou de la caséine [74] de couleur jaune verdâtre. Il représente près de 90% du lait mis en œuvre [75 ; 76].

3.2. Différents types de lactosérum

La composition et le type de lactosérum des usines laitières dépendent des types de fromages fabriqués, ainsi que des approches technologiques utilisés pour sa production [77 ; 78].

Selon l'acidité du sérum, on distingue deux types de sérums [79] :

- **Les lactosérums doux** (pH 6-7 et acidité inférieure à 18 °D) : issus des fabrications de pâtes pressées cuites et non cuites et de pâtes molles [80; 81]. La teneur en protéines est plus élevée que lactosérum acide car la coagulation présure entraîne la libération d'un fragment de la caséine κ (glycomacropéptide) [82].

- **Les lactosérums acides** (pH <5 et acidité supérieure à 18 °D) : issus de fabrication de pâtes fraîches et de caséines. [80; 81].

Quant aux minéraux, la teneur est fort variable en fonction du pH au moment de la fabrication. Elle dépend de la forme du phosphate de calcium colloïdal, dont la liaison avec la caséine diminue avec le pH. Pour les pâtes pressées et les pâtes cuites, on aura un fromage riche en calcium et phosphore et un lactosérum doux ne contenant que les minéraux solubles du lait. Pour les fromages frais (ou le sérum de caséine acide), on aura un fromage (ou caillebotte) déminéralisé, tandis que le lactosérum sera acide, riche en minéraux et notamment en calcium et phosphore [74].

3.3. Différentes technologies appliquées pour l'obtention des lactosérums

La poudre de lactosérum est obtenue par simple concentration et séchage on utilise l'osmose inverse et l'évaporation pour atteindre la teneur en solides requise (~50%) pour sécher le produit par atomisation [82].

Les principaux procédés d'obtention du lactosérum sont résumés dans la figure 4.

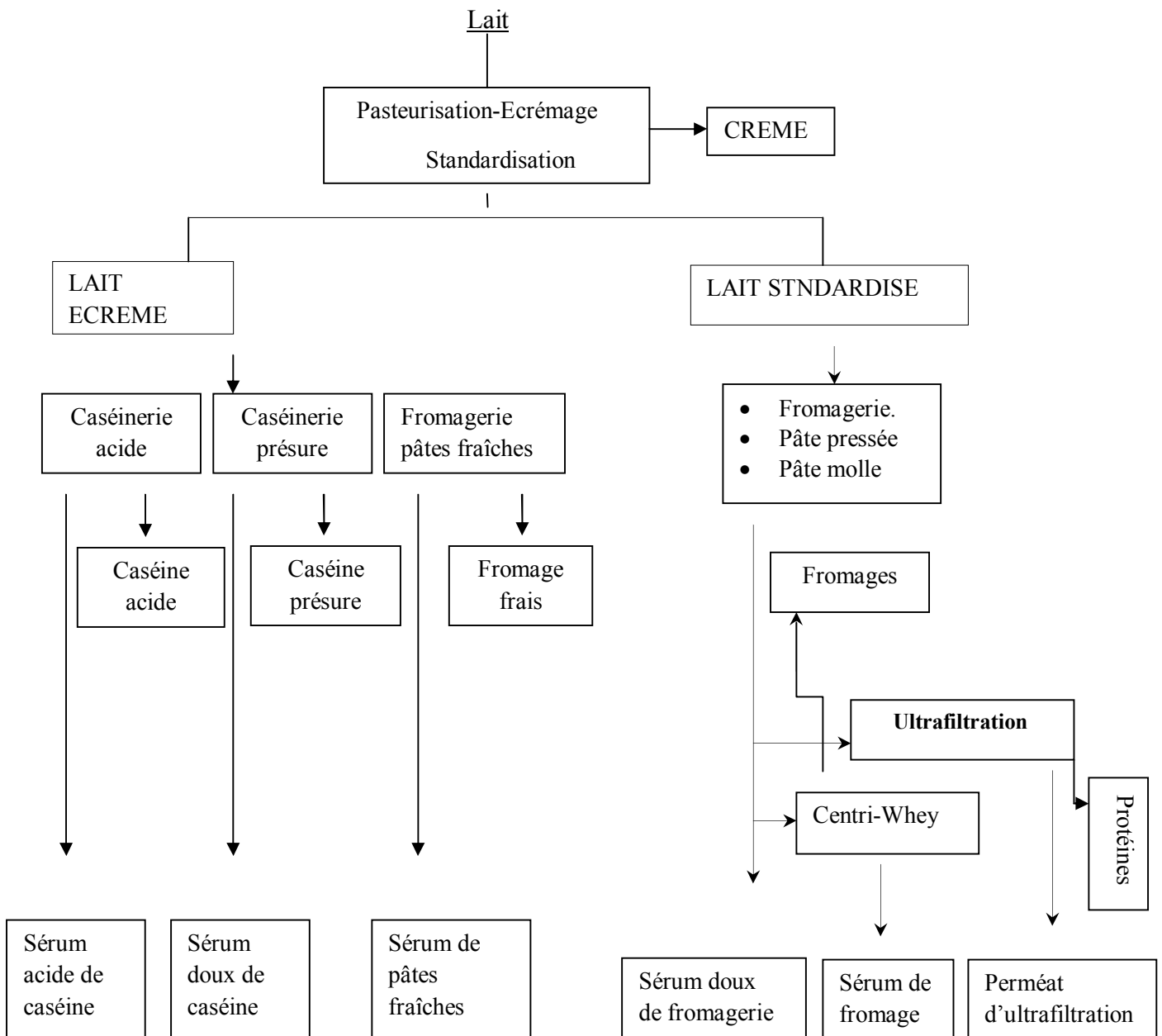


Figure 3.3.4: Schéma technologique d'obtention des principaux types de sérum issu de la première transformation du lait [74].

3.4. Composition de lactosérum

Si l'on regarde ce qui se passe en fromagerie, la plus grande partie de l'eau du lait se retrouve dans le lactosérum et avec elle, toutes les substances solubles [83].

Sa principale caractéristique est qu'il contient beaucoup de lactose, ce sucre représente une principale source de carbone pour les microorganismes qui intéressent l'industrie agroalimentaire, le lactosérum contient également des protéines solubles ou protéines sériques

qui restent en solution quand on précipite le lait, avec en plus des substances azotées non protéiques résultant de l'action des enzymes coagulantes ou du métabolisme des bactéries qui se développent dans le lait ou dans le coagulant. Aussi, il contient des sels minéraux tels que : Ca^{2+} , P, Na^+ , Cl, K^+ [84]. Ces trois composants constituent un milieu favorable pour le développement des microorganismes.

Tableau 3.3.3 : Composition chimique du lactosérum en (g/l) [85; 73].

Composition chimique	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matière sèche (MS)	55 à 75	55 à 65
Lactose	40 à 57	40 à 50
Lipides (MG)	0 à 5	0 à 2
Matières azotées totales (MAT)	7 à 11	4.8 à 10.5
Cendres	4 à 6	6 à 8
Calcium	0,4 à 0,6	1,2 à 1,4
Phosphore	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
Potassium	1,4 à 1,6	1,4 à 1,6
Chlorure	2,0 à 2,2	2,0 à 2,2
Acide lactique	0 à 0,3	7 à 8

3.5. Valorisation de lactosérum

Le lactosérum a été depuis longtemps considéré comme un sous produit encombrant, sans intérêt, dont il fallait se débarrasser aux moindres frais, en particulier en rejetant dans les eaux résiduaires des usines laitières.

Or, depuis quelques années, les recherches effectuées par la plupart des pays laitiers ont mis en évidence sa valeur nutritionnelle, qui tient à la fois à la présence du lactose et des protéines sériques [86]. Les différents domaines d'utilisation du lactosérum sont :

- **En alimentation humaine :** Les sérums concentrés et en poudres ont des applications dans les produits à base des céréales où ils agissent à la fois comme renforçateur des farines et améliorateur de goût et de couleur moins coûteux de la poudre de lait, ils tendent à la remplacer au moins en partie.

Ils sont utilisés aussi en mélange avec de la crème ou de la matière grasse butyrique ou végétale, des protéines et additifs divers (stabilisant, sucre, arôme, sels...etc.). Pour préparer divers produits crémeux, pâteux ou tartiner.

Ces protéines sont utilisées en alimentation infantile pour leurs qualités nutritionnelles (richesse en acides aminés essentiels), pour la préparation de plats cuisinés (rétention d'eau) et pour leur pouvoir moussant (confiserie, nougaterie).

La richesse en lactose en fait un auxiliaire actif dans le brunissement enzymatique où maillardisation appréciée en boulangerie et biscuiterie et viennoiserie [87].

- **En alimentation animal :** Les poudres sont principalement utilisées dans les aliments d'allaitement pour veaux. Elles sont également employées de même que concentré liquide, en mélange avec d'autres aliments, et pour divers aliments d'élevage (bovin, porcin, volailles) [87].

- **En médecine :** Actuellement, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum. L'utilisation de ces fractions est efficace contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc. [88].

- **Utilisation comme milieu de fermentation :** Le lactosérum pourrait être utilisé pour la production par voie microbienne de l'acide lactique, des vitamines (B2, B12), d'enzymes (protéase, amylase, pectinases, galactosidase et cellulase) et de matière grasse [86].

Selon Botofonja (1994) [89], la croissance de certaines souches telles que *Streptococcus lactis* serait bonne sur lactosérum seul du fait de la richesse de celui-ci en lactose.

Le lactosérum est un bon milieu de culture permettant le développement des levures qui utilisent le lactose comme source de carbone [90].

Une étude menée par Bergmair (2002) [91], sur la production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rammnosus RW 9595M* à été menée sur un milieu à base de permeat de lactosérum.

Selon Poget-Ramscier (1993) [91], le lactosérum est un bon milieu de culture pour la production d'acide lactique à l'aide des bactéries lactiques.

ACIDE LACTIQUE

4. Acide lactique

La place importante des BL, tant dans le domaine industriel que médical, réside dans leur capacité à fermenter rapidement les sucres en acide lactique et autres acides organiques [92]. L'acide lactique est bien le produit principal de la fermentation lactique à laquelle il a donné son nom (Chevreul, 1857).

4.1. Historique

L'acide lactique est utilisé depuis longtemps dans la conservation des aliments, il est découvert pour la première fois dans le lait fermenté par Scheele 1780 [93] et il est considéré au début comme un composant exclusif du lait.

Pasteur en 1857 a découvert que celui-ci n'est pas uniquement un composé du lait mais un métabolite fermentaire produit par certains microorganismes [94].

4.2. Définition et caractéristiques

L'acide lactique, ou acide α -hydroxypropionique, se présente sous deux formes optiquement actives dues à la présence d'un carbone asymétrique situé en α de la fonction acide. La configuration L(+) est lévogyre, la configuration D(-) est dextrogyre (Figure 6) [95] :



Figure 4.2.6: Formes optiques de l'acide lactique.

D'un point de vue alimentaire, la formation de D(-)-lactate par les bactéries lactiques en aliments fermentés et les boissons est indésirable, parce que D (-)-lactate n'est pas aisément

métabolisable chez les mammifères comprenant les êtres humains comparés à L (+) - lactate. La consommation excessive de D (-)-lactate peut mener aux perturbations médicales [96 ; 97 ; 98].

L'acide lactique est odorant, n'est pas volatile, possède un goût acide moyen et est catalogué comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Il possède un potentiel chimique important, c'est pourquoi il est largement utilisé en industrie. Il apparaît également comme un très bon conservateur naturel alimentaire tel que dans la choucroute, les olives, les yaourts, les fromages et divers produits cueillis [94].

4.3. Voies de fabrication

L'acide lactique est industriellement produit par la synthèse chimique ou par la fermentation microbienne. [99].

- La voie chimique :

La production d'acide lactique par cette voie présente l'intérêt d'utiliser des coproduits de l'industrie chimique, mais surtout de produire de l'acide lactique thermostable d'une haute pureté et incolore [100].

- La voie fermentaire :

La méthode biologique a l'avantage de produire un acide lactique optiquement pur en choisissant une souche de bactéries lactiques, tandis que la synthèse chimique a toujours comme conséquence un mélange racémique d'acide lactique [101]. La présence de L (+) – acide lactique avec la pureté optique élevée donne les acides polylactiques du point de fusion élevée et de la cristallinité élevée [102; 103]. Les microorganismes généralement utilisés pour sa production sont variés.

4.4. Microorganismes producteurs d'acide lactique

Un nombre très important de genres et d'espèces bactériennes et même quelques moisissures transforment des carbohydrates en acide lactique [100].

-Les bactéries lactiques

En production industrielle, on s'adressera essentiellement aux BL homofermentaires pour maximiser les rendements, et plus particulièrement au genre *Lactobacillus* qui est le plus utilisé que les genres *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Pediococcus* [95].

- Les moisissures

On note toutefois la production en anaérobiose de l'acide L(+) lactique par *Rhizopus oryzae* en présence d'une petite quantité de CO₂ [95].

L'utilisation de ce champignon présente un intérêt, car elle ne requiert pas de sources d'azotes organiques, utilise des glucides tel que les hexoses ou les pentoses et est facilement séparable du milieu de culture lors des procédés de purification de l'acide lactique [100].

4.5. Domaines d'emploi de l'acide lactique

L'acide lactique a été longtemps employé dans les applications industrielles alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [104]. Voir le Tableau 4.

Tableau 4.5. 4 : Emploi de l'acide lactique dans l'industrie [80].

Type d'industrie	Utilisations	Propriété	Forme
Agro-alimentaire	<p>-Boisson gazeuses, jus de fruits, sirops, bière, cidre</p> <p>-Cornichon, pickles, olives choucroutes</p> <p>-confiserie (bonbon acidulés)</p> <p>-poudres levantes,</p> <p>-viandes, saucisse, lard, confitures, sorbets, laits en poudre, fromages, pain</p>	<p>Acidulant</p> <p>Conservateur</p> <p>Conservateur</p> <p>Favorise la fermentation</p> <p>Surprime la cristallisation du sucre</p> <p>Stabilisant</p> <p>Agent de sapidité et de conservation</p>	<p>Acide lactique</p> <p>Mélange acide lactique/lactate de sodium</p> <p>Lactate de calcium</p>
Pharmacie-Cosmétologie	<p>Déficience en calcium ou en fer</p> <p>Antiperspirant</p> <p>Préparation dermatologique</p> <p>Implants contraceptifs</p>	<p>Tampon</p> <p>Support biodégradable</p>	<p>Sels de calcium ou de fer</p> <p>Lactate d'aluminium</p> <p>Mélange d'acide</p>

			lactique/lactate de soude Polymères d'acide lactique (copolymères d'acide lactique et glycolique)
Industrie chimique	Solvant de peinture Métallurgie : préparation des surfaces Industrie textile : mordant pour peinture Tannerie= décalcification des peaux Préparation des résines	plastifiants	Lactate de butyle, lactate d'éthyle Acide lactique Lactate

LES EXOPOLYSACCHARIDES

5. La production d'exopolysaccharides (EPS)

5.1. Définition d'un exopolysaccharides

Les bactéries produisent souvent des polysaccharides de surface. Ces polysaccharides de surface sont soit des constituants de la paroi (peptidoglycanes, acides techoïques, lipopolysaccharides...), soit excrétés (polysaccharides capsulaires enrobant la cellule et polysaccharides libérés dans le milieu de culture). Ces polysaccharides excrétés sont souvent appelés polysaccharides exocellulaires ou encore exopolysaccharides (EPS), terme proposé tout d'abord par Sutherland [104] puis repris par Cerning [105] comme appellation générale. Les polysaccharides exocellulaires ou EPS sont divisés en deux groupes : les homopolysaccharides constitués d'un seul type de monosaccharide (dextranes, glucanes, ...) et les hétéropolysaccharides constitués de monosaccharides différents (xanthane, gellane...).

5.2. Intérêts biotechnologiques et thérapeutiques des EPS :

5.2.1. Agents texturants

Les EPS sont des polymères très largement employés comme additifs dans l'industrie alimentaire pour leur rôle d'agents épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants. La majorité sont d'origine végétale comme la cellulose et l'amidon, d'utilisation peu coûteuse.

5.2.2. Agents prébiotiques

D'après Gibson & Roberfroid [106], un prébiotique est "un ingrédient alimentaire non digestible qui influence favorablement l'hôte par stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité de l'une ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes du côlon en améliorant ainsi la santé de l'hôte". Les prébiotiques qui sont disponibles sur le marché européen sont des fructanes (fructosyl prébiotiques) de type inuline ou oligofructose (les oligofructoses dérivent de l'inuline par hydrolyse enzymatique partielle). L'inuline est un composé naturel extrait des rhizomes des végétaux.

5.3. Principales fonctions des EPS

Les EPS ne semblent pas indispensables à la survie des bactéries qui les produisent. Ils ne paraissent pas non plus être utilisés comme source d'énergie [108]. La capsule est pourtant d'un grand intérêt pour les cellules puisqu'elle est capable de les protéger contre la dessiccation, la prédation, de leur permettre d'adhérer à diverses surfaces (colonisation, formation de biofilm) et peut même leur conférer un certain pouvoir pathogène. La présence d'EPS est indispensable dans les associations symbiotiques entre certaines plantes et certaines bactéries. Ils ont un intérêt rhéologique en tant qu'agents texturants mais peuvent aussi avoir un intérêt dans le domaine médical en tant qu'agents anti-tumoraux et antimicrobiens [108].

5.3.1. Rôle physiologique

Le rôle biologique de ces polysaccharides n'est pas bien élucidé. Il a été proposé que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe et logique aux pressions sélectives de l'environnement [109]. En effet, la production d'EPS demande beaucoup d'énergie et il paraît donc improbable qu'une bactérie utilise autant d'énergie et de substrat sans en tirer un avantage. Sous des conditions naturelles, et donc fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de survivre [110].

5.3.2. Rôles biologiques

5.3.2.1. Protection

La capsule peut avoir un effet protecteur pour la bactérie, elle est une barrière contre l'hostilité environnementale (protection contre la prédation, la phagocytose). De plus, étant très hydratée, elle permet à la bactérie de mieux résister à la dessiccation. Cette caractéristique est mise à profit lors de la fabrication de pâtes fromagères allégées. En effet, les polysaccharides capsulaires synthétisés par *St. thermophilus* permettent d'augmenter la teneur en eau dans la mozzarella allégée en matière grasse [111].

5.3.2.2. Adhésion

Dans certaines conditions les micro-organismes peuvent avoir la capacité de former des agrégats ou des biofilms leur permettant une meilleure survie en favorisant leur nutrition et leur développement. Cette capacité permet la colonisation de surfaces les plus diverses (tissus

animaux, végétaux, matériaux inertes tels que polymères, acier etc...) mais généralement très hydratées ou submergées. Au sein d'un biofilm, les bactéries sont englobées dans des biopolymères polysaccharidiques et/ou protéiques. Les biofilms peuvent être utilisés par l'Homme dans les stations d'épuration mais sont le plus souvent indésirables car ils peuvent se former partout où il y a de l'humidité et des conditions non aseptiques.

MATERIEL ET METHODES

L'étude expérimentale porte sur deux volets liés au criblage de bactéries lactiques à fort potentiel de produire de l'acide lactique, d'une part et la valorisation du lactosérum doux par la production de deux produits d'intérêt industriel en utilisant des souches de bactéries lactiques sélectionnées, d'autre part.

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Industrielle au département de Chimie Industrielle, faculté des sciences de l'ingénieur, université Saàd Dahlab de Blida.

Matériel

Tout le matériel utilisé est cité en annexe 1.

Méthodes

Première partie : Isolement et criblage de BL à fort potentiel acidifiant

1.1. Echantillonnage

Quatre types de prélèvements ont été réalisés à partir :

- de la couche superficielle de la peau : vache et génisse (race : Fleek vit), chèvre (race locale), brebis et agneau (race : Ouled Djellal). Ces animaux provenaient d'une petite ferme à Hadjout (wilaya de Tipaza).
- des muqueuses des animaux : intestins de poulet, zone buccale (gencive).
- des surfaces des végétaux (légumes et fruits).
- des eaux de produits fermentés.

Au total, 21 prélèvements ont été effectués :

- 12 à partir des animaux dont la répartition est indiquée au niveau du tableau 5.
- 07 prélèvements ont été effectués à partir des surfaces de fruits et de légumes : Pomme, chou-fleur, chou, betterave, pomme de terre, tomate et carotte.
- 02 prélèvements de l'eau de produits fermentés : olive et cornichon.

Tableau 1.5.5: Nombre et endroit de prélèvement à partir des animaux :

Origine du prélèvement	Race	Age	Nombre et endroit de prélèvement
Brebis	Ouled Djellal	1 an	- 01 / trayon droit - 01 / bouche (gencive)
Agneau	Ouled Djellal	3 jours	- 01 / bouche (gencive)
Vache	Fleek vit	3 ans	- 01 / trayon droit - 01 / bouche (gencive)
Génisse	Fleek vit	4 mois	- 01 / bouche (gencive)
Chèvre	Locale	/	- 01 / trayon droit + gauche - 01/ bouche (gencive)
Poulet	De la petite ferme	/	- 04 / intestin.

Les techniques de prélèvements sont visualisées au niveau des photos des figures 3-7.

A partir de surface des animaux : Les prélèvements ont été réalisés aseptiquement, les mains et les mamelons (de vache, chèvre et brebis) ont été lavés avec l'eau distillée stérile, le trayon a été gratté à l'aide d'un écouvillon. Cet écouvillon a été immédiatement mis dans un tube à vis contenant 9 ml de diluant TSE.

A partir des muqueuses :

- La bouche : Un écouvillon a été introduit dans la bouche de l'animal, après avoir gratté la gencive, cet écouvillon a été mis dans un tube à vis de 9 ml de TSE.

- L'intestin : L'intestin a été coupé en 4 parties et vidé de son contenu. Pour la mise en contact de la muqueuse intestinale avec le diluant, l'intestin a été coupé longitudinalement puis découpé en petits fragments et introduits dans des tubes à vis de 9 ml de TSE.

A partir de l'eau des produits fermentés : 10 ml de l'eau de fermentation de cornichon et d'olives fermentés ont été prélevés à l'aide d'une pipette graduée stérile et ont été mis dans des tubes à vis stériles.

N.B. Les échantillons ont été conservés pendant la période de transport dans une glacière puis ont été analysés juste à l'arrivée au laboratoire.

A partir des surfaces des végétaux : Les fruits et les légumes achetés du marché ont été transportés au laboratoire le jour même. La surface a été enlevée à l'aide d'un couteau stérile et coupée en petits fragments puis submergés dans 50 ml de TSE.



Figure I.1.3 : Photos montrant les endroits et les techniques de prélèvements à partir des animaux

A : prélèvement à partir des mamelles de vache ;

B : prélèvement à partir de la bouche (gencive) de vache;

C : prélèvement à partir de la bouche (gencive) de brebis ;

D : prélèvement à partir des mamelles de brebis ;

E : prélèvement à partir de la bouche (gencive) de chèvre ;

F : prélèvement à partir des mamelles de chèvre.



Figure 1.1.4 : Photos montrant les prélèvements à partir des intestins de poulet.



Figure 1.1.5: Prélèvements des animaux dilués dans le TSE.



Figure 1.1.6: Prélèvements des intestins dilués dans le TSE.



Figure 1.1.7: Prélèvements des végétaux (fruits et légumes) dilués dans le TSE.

1.2. Isolement et dénombrement des BL

1.2.1. Ensemencement

- **Milieux de culture** : Les milieux utilisés sont MRS et M17 qui sont les plus sélectifs pour isoler les différents genres de BL [114].
- MRS est le plus utilisé pour l'isolement et le dénombrement des *Lactobacillus* et de la plus part des autres genres de BL.
- M17 est préconisé pour les *Streptococcus* et *Lactococcus*.

- **Modes opératoire :** Deux techniques d'ensemencement ont été utilisées lors de ce travail :
 - Méthode d'étalement : 0,1 ml de la solution mère ou la dilution est déposé puis étalé à la surface de milieu utilisé.
 - Méthode d'inclusion en milieu solide : la gélose préalablement fondue puis refroidie à 45 °C est coulé en boîtes de Pétri contenant 0,1 ml de l'échantillon puis homogénéisé par un mouvement en 8.

- **Conditions d'incubation :** Au total, quatre séries de boîtes de Pétri contenant les milieux sélectifs destinés pour l'isolement et le dénombrement de BL ont été préparées :

1^{ère} série : 01 M17 + 01 MRS sont **incubées en aérobiose. Incubation à 42 °C** pendant 48 à 96 h ;

2^{ème} série : 01 M17 + 01 MRS sont **incubées en jarre avec sachet de type Anaero Gen™ pour créer l'anaérobiose. Incubation à 30 °C** pendant 48 à 96 h ;

3^{ème} série : 01 M17 + 01 MRS **ensemencées en profondeur. Incubation à 42 °C** pendant 48 à 96 h ;

4^{ème} série : 01 M17 + 01 MRS **ensemencées en profondeur. Incubation à 30 °C** pendant 48 à 96 h.

1.2.2. Choix des isolats de BL

Le choix des isolats se fait selon la dominance, la rareté, la couleur et la forme des colonies. Ces colonies sont repiquées en stries et incubées dans les mêmes conditions d'isolement.

1.3. Criblage des BL sur milieu Chalmers

La présélection est effectuée sur le milieu Chalmers à pH 6,8. Après l'incubation dans les conditions précédemment cités, les souches à teinte rose et halo claire sur le pourtour due à la formation de lactate de calcium [112] sont considérées initialement comme souches typiques de BL. (Voir préparation de Chalmers en annexe 1)

Ces isolats sont caractérisés en se basant sur des tests spécifiques de BL :

- **La catalase** : On met en évidence la catalase en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition de bulles abondantes dans l'émulsion ainsi que les bactéries à pseudo-catalase [112].
- **L'oxydase** : on étale sur un disque d'oxydase une colonie bactérienne. Un test positif se traduit par une coloration violette en 10 secondes [149].
- **Le Gram** : (Voir annexe 2).

Seules les bactéries à catalase négative (ou pseudo-catalase), oxydase négative, Gram-positif, à teinte rose et halo claire sont retenues.

1.4. Sélection d'une souche à fort potentiel de production d'acide lactique dite « acidifiante »

1.4.1. Milieu utilisé

Le milieu utilisé pour la comparaison des performances des souches productrices d'acide lactique est le lait reconstitué à 100 g/l avec la poudre du lait écrémé (LER) (provenant de la laiterie Trèfle de Blida) et stérilisé à l'autoclave à une température supérieure ou égale à 85 °C pendant au moins 20 min. Le choix de ce milieu se base selon des impératifs de composition constante et de similitude avec le milieu d'application [12].

Le LER est inoculé par des disques de culture de souches préalablement poussées (18 à 24 h) à raison d'un disque par 20 ml de LER.

Deux paramètres (acidité et pH) sont suivis pour cette sélection.

1.4.2. Paramètres mesurés

La mesure de l'activité acidifiante, d'un ensemble de souches pour les caractériser dans le but de les comparer, pose de nombreuses questions sur les conditions de cette mesure : état physiologique des cellules, dose d'ensemencement, température et durée d'incubation, régularité de la qualité du milieu de culture etc. [114].

- **pH** : La façon la plus élégante et la moins coûteuse pour mesurer l'acidification produite est de suivre l'évolution du pH dans le milieu. Cette technique présente l'avantage de donner une information en temps réel et en continu [12]. La mesure du pH du milieu s'effectue directement à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné et ne risque pas d'être colmaté par les protéines [114].

- **Acidité :** L'acidité du milieu s'exprime couramment en degrés Dornic ; officiellement et par convention, on la donne en gramme d'acide lactique par litre de lait.

1°D = 0,1g d'acide lactique par litre de lait

Une solution basique de soude $1/9 \text{ mol. l}^{-1}$ est ajoutée à 10 ml de lait additionné de deux gouttes de phénolphaléine, indicateur coloré qui passe de l'incolore en milieu acide au rose vers $\text{pH}=8,3$. Dans ces conditions 0,1 ml de la solution basique définie précédemment correspond à 1 degré Dornic. Ce volume neutraliserait 10 ml d'une solution d'acide lactique contenant 0,1g par litre. On peut remarquer que 8,3 est la valeur du pH qui correspond à peu près à la neutralisation d'acides faibles comme ceux du lait.

Un lait dont le lactose n'a pas encore été transformé en acide lactique a une acidité de l'ordre de 16 °D [145].

1.4.3 Autres paramètres mesurées

- **Détermination du poids sec :** la culture bactérienne a été récoltée par centrifugation, après un lavage soigneux à l'aide de l'eau distillée stérile, le culot a été desséché à 100-110 °C jusqu'à poids constant que l'on exprime généralement en gramme de matière sèche par litre. Lorsque la culture étudiée contient de la mousse ou une quantité importante d'éléments nutritifs insolubles, le volume de liquide dans l'échantillon se trouve réduit d'autant et la matière sèche cellulaire par unité de volume est alors largement sous-estimée. C'est la raison pour laquelle on exprime généralement les résultats en gramme de matière sèche par kilo de milieu [113]. (Voir le détail en annexe 3).
- **Mesure de lactose consommé :** Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode 3-5 DNS [149]. Deux (02) ml d'échantillon est ajouté à 2 ml de DNS et 3ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite porté à 100 °C pendant 5 min puis refroidis dans de la glace afin d'arrêter la réaction. On ajoute enfin 15 ml d'eau distillée avant de réaliser la lecture de la densité optique à la longueur d'onde de 530 nm. (Voir le détail en annexe 3).

1.5. Caractérisation des isolats

La caractérisation **phénotypique** a été réalisée en deux étapes.

La première consiste à tester tous les isolats par la coloration de Gram, à la production de catalase et l'oxydase.

La deuxième est basée sur l'étude morphologique (macroscopique et microscopique).

Seule la souche sélectionnée a été identifiée **génotypiquement**.

L'identification génotypique (séquences de l'ADN correspondant à l'ARNr 16S) a été faite dans le Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie. Les grandes étapes de manipulation sont indiquées ci-dessous comme suit :

- Extraction de l'ADN chromosomique;
- Electrophorèse des ADN totaux;
- Amplification du gène d'ADN correspondant à l'ARN 16S;
- Séquençage du gène d'ADN correspondant à l'ARN 16S.

N.B. La souche a été transportée conservée sur milieu MRS gélosé et les manipulations ont été réalisées par Dr. Jaouadi Bassem, Maître assistant au sein du laboratoire de microorganismes et biomolécules (CBS, Tunisie).

1.6. Conservation des isolats

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné (MRS ou M17). Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines. La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu MRS ou M17 (bouillon) contenant 30 à 40% de glycérol et stockés à une température de -20 °C [53].

Deuxième partie : Valorisation du lactosérum doux par la production des produits d'intérêt alimentaire ou textural.

2.1. Cinétique de la production d'acide lactique par la souche sélectionnée

2.1.1. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum se fait par préculture en utilisant le LER à 10% (P/V). Après homogénéisation, ce milieu est réparti sur des flacons stériles à raison de 20 ml/flacon, il est ensuite autoclavé à 100 °C pendant 10 minutes, puisensemencé par un seul disque de culture pure. Ces flacons sont incubés à 42 °C pendant 18 h.

2.1.2. Préparation des milieux de cultures

1) Lactosérum doux : le milieu choisi pour la production d'acide lactique par la souche de BL isolée localement est à base de lactosérum (LS) provient de laiterie Trèfle de Blida dans le but de revaloriser ce déchet.

C'est du lactosérum doux en poudre ayant les caractéristiques suivantes : lactose (70%), matière grasse (0%) et protéines (5 à 7%).

Le LS est utilisé non déprotéiné à cause de leur composition riche en acide aminés (Luquet, 1990). Il est reconstitué à 10% (P/V), ce milieu est réparti sur des flacons, puis autoclavé à 100 °C pendant 10 minutes.

2) Lait écrémé : des fermentations en batch ont été réalisées dans des flacons de 250 ml à raison de 200 ou 100 ml/flacon. Les cinétiques d'acidifications sont réalisées par inoculation de LER stérile et de lactosérum doux par une proportion de 3% (v/v) de la pré-culture. L'évaluation de l'acidité produite est déterminée par titrimétrie et par la mesure du pH chaque heure jusqu'à la 7^{ème} heure et aussi après 24 heure d'incubation.

2.1.3. Essais d'optimisation de la production d'acide lactique sur LS doux

La composition de milieu LS étant relativement pauvre par rapport aux exigences nutritionnelles des BL, donc il est indispensable de l'enrichir par l'addition de certains composés stimulant leur croissance.

2.1.3.1. L'enrichissement par la matière sèche

Le lactosérum a été enrichi en poudre de LE ayant les concentrations suivantes : **2, 4, 6** et **8g/l** (P/V). Un suivi de la cinétique d'acidification et la variation de pH du milieu enrichi à différentes concentrations est effectué chaque heure jusqu'à la 7^{ème} h et puis après 24h.

Le tableau 6 résume les conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'LE.

Tableau 2.1.3.1.6: conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'LE.

Paramètres variables	Paramètres fixes
-LE=0%	-température : T=42°C
-LE=2%	-pH : au voisinage de 6
-LE=4%l	-inoculum : 3%(v/v) de préculture.
-LE=6%l	-absence d'agitation et d'aération
-LE=8%	-durée d'incubation =24h
	-milieu de culture : 200ml de lactosérum doux.

2.1.3.2. La supplémentation en source d'azote

En tant que source de carbone, le lactosérum n'était pas suffisant alors il est indispensable de le compléter avec une source azotée. Dans la littérature la quasi-totalité des auteurs utilisent l'extrait de levure (EL) pour améliorer la croissance et la production d'acide lactique. Mais ce produit est onéreux en production industrielle et il serait plus intéressant de tester d'autres sources plus économiques comme la liqueur de maïs ou corn steep liquor CSL [150]. Voir tableau 17 en annexe 4.

- **Extrait de levure** : Pour augmenter le rendement de croissance et de production d'acide lactique, on essaiera de compléter le lactosérum par l'extrait de levure qui offre une excellente source d'azote pour les BL, généralement moins dispendieux que les peptones [82].

Afin de déterminer la concentration optimale de l'extrait de levure, différentes concentrations ont été ajoutées au LS : **2,5, 5, 10, 20, et 30 g/l**.

Le tableau 7 résume les conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'EL.

Tableau 2.1.3.7: Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de l'EL.

Paramètres variables	Paramètres fixes
Concentration d'extrait de levure : - EL=0g/l - EL=2,5g/l - EL=5g/l - EL=10g/l - EL=20g/l - EL=30g/l	- température : T= 42 °C - pH : au voisinage de 6 - inoculum : 3% (v/v) de préculture - absence d'agitation et d'aération - durée d'incubation =24h - milieu de culture : 200 ml de lactosérum doux.

o **Corn steep liquor «CSL»:**

Le CSL utilisé dans nos expérimentations provient du groupe SAIDAL de Médéa. Les mentions d'étiquetage sont les suivantes : nom usuel « Eau de Trempage du Maïs ». C'est le liquide dans lequel ont lavé les grains de maïs qui ont été trempés, fermentés et concentrés. Voir caractéristiques et composition sur le tableau 8.

Tableau 2.1.3.8 : caractéristiques et composition de CSL utilisé.

Composition	Limites
- aspect	- Jaunâtre, à légèrement brun pour le liquide
- substance sèche	- 48 - 55 (w/w)
- acidité libre (en tant qu'acide lactique)	- 12 - 13%
- pH	- 3,8 - 4,1
- sucre réducteur	- 2,0%
- acide aminé	- 1,6 - 2,4%
- azote total	- 3,7 - 3,8%
- protéines	- 23 - 24%
- les acides aminés libres	- 11 - 12% (par rapport la matière sèche)

Afin de déterminer la concentration optimale de CSL, le lactosérum a été enrichi avec différentes concentrations : **2,5, 5, 10, 20, et 40 g/l**.

Le tableau 9 résume les conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de CSL.

Tableau 2.1.3.9 : Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de CSL.

Paramètres variables	Paramètres fixes
- CSL=0g/l - CSL=2,5g/l - CSL=5g/l - CSL=10g/l - CSL=20g/l - CSL=40g/l	- température : T=42°C - pH : au voisinage de 6 - inoculum : 3% (v/v) de préculture - absence d'agitation et d'aération - durée d'incubation =24h - milieu de culture : 200 ml de lactosérum doux. - le pH de CSL est ajusté à 6,30 par une solution de NaOH 5N.

2.1.3.3. La Supplémentation par le Tween 80

Le lactosérum a été supplémenté en Tween 80 à raison de **0,2, 0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 ml** par litre du sérum.

Le tableau 10 résume les conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de Tween 80.

Tableau 2.1.3.3.10 : conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration de Tween 80.

Paramètres variables	Paramètres fixes
Tween 80 = 0 ml/l Tween 80 = 0.2 ml/l Tween 80 = 0,5 ml/l Tween 80 = 1,0 ml/l Tween 80 = 1,5 ml/l Tween 80 = 2,0 ml/l	- température : T=42°C - pH : au voisinage de 6 - inoculum : 3%(v/v) de préculture - absence d'agitation et d'aération - durée d'incubation =24h - milieu de culture : 100 ml de lactosérum doux.

2. 1.3.4. La supplémentation en sels minéraux

Les sels minéraux : $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ et KH_2PO_4 , ont été retenus pour leurs rôles importants dans la nutrition des BL. Différentes concentrations sont testées pour déterminer les valeurs qui donnent le meilleur rendement en acide lactique (tableau 11).

Le tableau 11 résume les conditions opératoires concernant l'optimisation des concentrations des sels minéraux.

Tableau 2.1.3.4.11 : conditions opératoires concernant l'optimisation des concentrations des sels minéraux.

Paramètres variables				Paramètres fixes
$MgSO_4$	$MnSO_4$	$FeSO_4$	KH_2PO_4	
0,1g/l	0,025g/l	0,01g/l	0,1g/l	- température : $T=42^{\circ}C$ - pH : au voisinage de 6 - inoculum : 3%(v/v) de préculture - absence d'agitation et d'aération - durée d'incubation =24h - milieu de culture : 100 ml de lactosérum doux.
0,2 g/l	0,05g/l	0,02g/l	0,2g/l	
0,4 g/l	0,1g/l	0,03g/l	0,3g/l	
0,6 g/l	0,15g/l	0,04g/l	0,4g/l	
0,7g/l		0,05g/l	0,5g/l	
			0,6g/l	

2.1.4. Production d'acide lactique sur milieu à base du lactosérum optimisé

Quatre essais ont été réalisés pour l'obtention d'un milieu optimal naturel peu coûteux en utilisant les concentrations optimales **précitées** de chaque composant.

Après inoculation du lactosérum supplémenté par notre souche, un suivi est réalisé chaque heure jusqu'à la 7^{ème} heure et après 24 heures. Les conditions de fermentation ont été fixées comme suit : -Température = $42^{\circ}C$; pH : au voisinage de 6 ; Inoculum : 3% (v/v) de préculture ; Absence d'agitation et d'aération ; Durée d'incubation = 24h et Milieu de culture : 200 ml de lactosérum doux.

2.2 Cinétique de la production d'exopolysaccharides par la souche *Streptococcus thermophilus* 1066 sur milieu à base du LS doux

La production des EPS a été réalisée dans un milieu à base du LS doux en respectant les mêmes conditions détaillées comme dans le cas de la production d'acide lactique.

La souche utilisée est une souche épaississante connue par la production d'exopolysaccharides obtenue à partir du laboratoire de Génétique Microbienne. INRA–CRJ. 78352 Jouy en Josas cedex (France).

2.2.1 Les milieux utilisés pour la production d'EPS

Le milieu Elliker est considéré comme témoin négatif et le milieu LER comme témoin positif pour la production des EPS [53]. Le milieu LER est supplémenté par l'extrait de levure à différentes concentrations (g/l) : 0,5, 1,5 et 2,5. Une supplémentation par le glucose (25 g/l) est assurée pour favoriser la production d'EPS.

La production d'EPS sur le milieu à base du LS doux a été effectuée en essayant aussi les supplémentations par l'extrait de levure à différentes concentrations (g/l) : 0,5, 1,5 et 2,5.

2.2.2 Les paramètres de suivi de la production d'EPS

Avant toute mesure, il faut assurer une extraction d'EPS produites dans le milieu de culture. Le bon rendement d'extraction est basé sur l'extraction des EPS par l'éthanol selon la méthode décrite par Girrafa et Bergère [147] comme suit :

- Précipitation des protéines du lait par l'addition de 8.5 ml d'acide trichloracétique (TCA à 0.17%) à 10 ml d'échantillon.
- L'éthanol (5%) est additionné au surnageant (à volumes égaux).
- Une deuxième précipitation des polysaccharides à l'éthanol est nécessaire.

Le dosage des EPS est réalisé par spectrophotométrie à $\lambda = 488$ nm selon la méthode du Dubois *et al.* (1956) [144]. Les résultats ont été calculés par rapport à courbe étalon obtenue à partir des dilutions de glucose dans de l'eau distillée et exprimés en mg glucose ml⁻¹.

- **Détermination du pH**

La détermination du pH du lactosérum brut s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné.

- **Mesure de la viscosité**

La viscosité des cultures est mesurée à 43°C à l'aide d'un viscosimètre à cylindres coaxiaux (physica rhéolab MC1) à une vitesse de déformation de 50 min⁻¹. Elle est exprimée en pa.s.

2.2.3 Quantification d'EPS par le dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois et *al.* [144] dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Annexe 8).

La courbe étalon est établie en se basant sur la quantité du glucose équivalent déterminée par méthode de Dubois et *al.* [144].

Protocole expérimental :

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante.
- Incuber au bain marie à 30 °C pendant 20 min.
- Mesurer la coloration jaune orangé à 488 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Première partie : Isolement et dénombrement des bactéries lactiques.

1.1. Dénombrement des BL

Les résultats de dénombrement des BL sont récapitulés dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 1.1.12 : Dénombrement des BL dans les échantillons des animaux.

Echantillons	BL (UFC / ml)			
	MRS (42 °C)	MRS (30 °C)	M17 (42 °C)	M17 (30 °C)
Vch (MTD)	10	220	0	410
Vch (G)	30	180	10	600
Gss (G)	0	700	10	870
Br (MTD)	0	10	0	140
Br (G)	05	30	03	1520
An (G)	0	0	0	510
Chv (G)	0	01	0	3480
Chv (MTD)	0	0	0	50
Chv (MTG)	0	0	0	40
In p ₁	380	900	1300	1130
In p ₂	2440	1100	800	3300
In p ₃	1470	750	3070	1000
In p ₄	1160	1190	2420	2520

Vch : Vache. **Gss** : Génisse. **Br** : Brebis. **An** : Agneau. **Chv** : Chèvre. **In** : Intestin. **MTD** : Mamelle Trayon Droit. **MTG** : Mamelle Trayon Gauche. **G** : Gencive. **p₁**: La partie une (1) de l'intestin. **p₂** : La partie 2 de l'intestin. **p₃**: La partie 3 de l'intestin. **p₄**: La partie 4 de l'intestin.

Tableau 1.1.13 : Dénombrement des BL dans les échantillons des végétaux et produits fermentés.

Echantillons	BL (UFC / ml)			
	MRS (42°C)	MRS (30°C)	M17 (42°C)	M17 (30°C)
Pm	00	C	0	150
Tm	0	1860	0	0
Pmt	0	0	C	60
Crtt	0	C	10	C
Bt	10	2310	10	310
Ch	10	1360	0	1020
Chf	10	300	0	1020
Cor	0	160	0	0
Olv	0	2150	0	10

Pm : pomme. **Tm** : Tomate. **Pmt** : pomme de terre. **Crtt**: carotte. **Bt** : betterave. **Ch**: Chou. **Chf** : Chou-fleur. **Cor** : Cornichon. **Olv** : Olive. **C** : contamination.

L'analyse des résultats montre que les boîtes incubées à 30 °C sont plus peuplées de BL que celles incubées à 42 °C ainsi que la présence des BL chez les végétaux est à moindre degré que chez les animaux.

Ce taux élevé à 30°C peut être justifié par la composition de milieu de culture, d'après Pilet et *al.* (1998) [16], il n'existe pas de milieux sélectifs pour le dénombrement des BL, donc les flores contaminantes peuvent se développer relativement mieux à 30 °C qu'à 42 °C étant donné que cette dernière est plus sélective et que la plus part des flores contaminantes sont mésophiles.

Le taux faible chez les végétaux peut être justifié par l'origine de ces derniers qui sont achetés du marché locale (ne sont pas frais).

1.2. Isolement de BL

A partir des 21 prélèvements effectués, nous avons obtenu 149 isolats sur ces isolats seuls 95 ont pu rester en notre possession car le reste ayant été contaminé par erreur de manipulation et/ou détruit par de mauvaises conditions de conservation (Voir le tableau 18 en annexe 5).

1.3. Criblage de BL sur milieu Chalmers

La présélection des isolats sur milieu Chalmers nous a permis d'écarter 79 isolats, donc seules 16 souches sont considérées initialement comme BL (Figure 8).

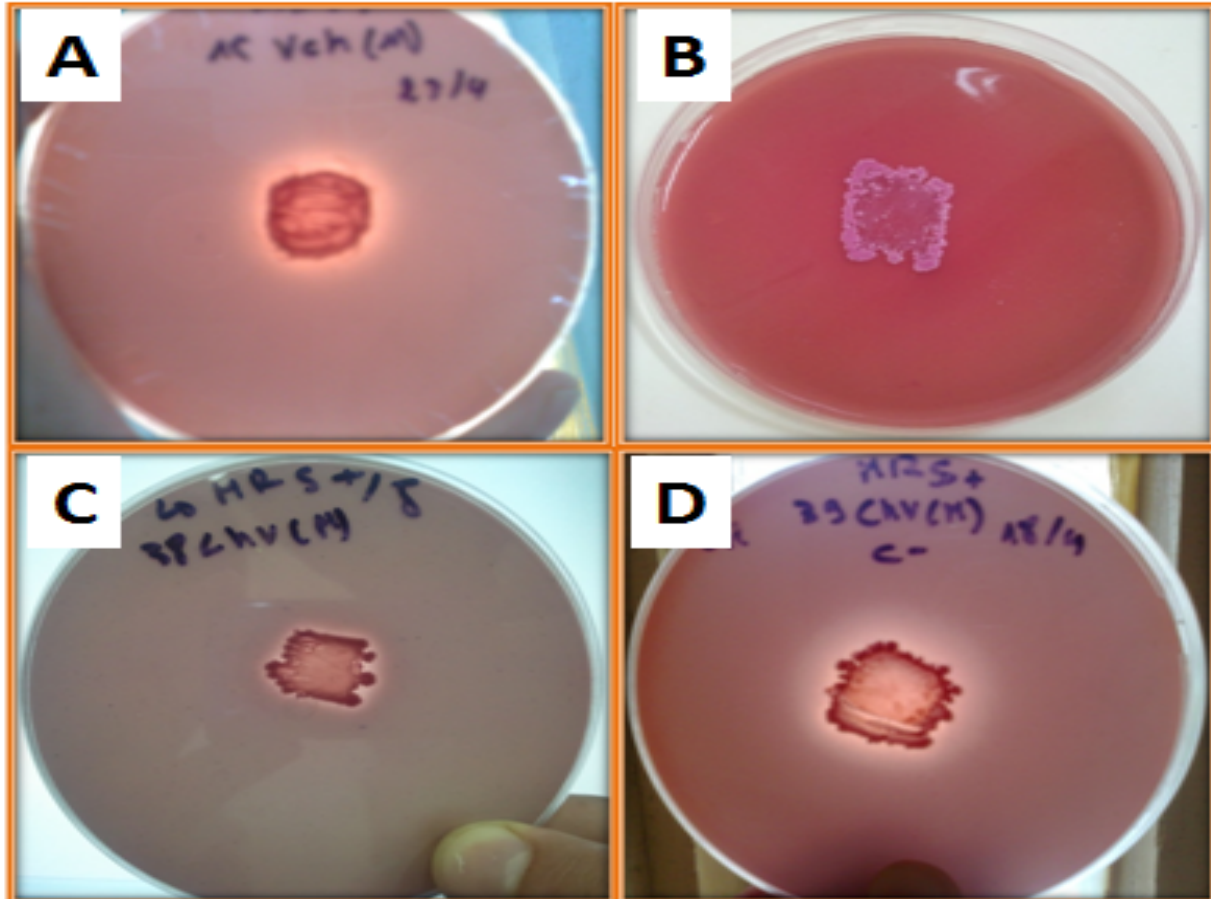


Figure I.3.8 : Test de présélection de quelques souches sur milieu Chalmers. Montre l'aspect des colonies sur milieu Chalmers. **A** : halo formé par la souche 15. **B** : les teintes sur la surface de la colonie de la souche 15. **C** : halo formé par la souche 38. **D** : halo formé par la souche 39.

Les BL donnent à la surface de ce milieu des colonies à teinte rose entourées d'une zone claire due à la formation de lactate de calcium [112].

1.4. Caractérisation des isolats de BL

Les résultats obtenus des tests de différenciation spécifiques de BL sont regroupés sur les tableaux 14 et 15.

Tableau 1.4.14 : Tests préliminaires des isolats de BL.

Les souches	Catalase	Oxydase	Gram
7 Br(M)	–	–	+
15 Vch(M)	–	–	+
20 Vch(M)	–	–	+
30 Chv(M)	–	–	+
35 Vch(M)	–	–	+
37 An(G)	–	–	+
Les souches	Catalase	Oxydase	Gram
38 Chv(M)	–	–	+
39 Chv(M)	–	–	+
43 Chv(M)	–	–	+
73 Inp ₃	–	–	+
77 Inp ₃	+p	–	+
78 Inp ₄	+ p	–	+
1* Bt	+p	–	+
7* Chf	+ p	–	+
10* Chf	–	–	+
20* Bt	–	–	+

+ : Réaction positive, – : réaction négative, +p : pseudocatalase. (M) : mamelle.

Tableau 1.4.15 : Caractérisation morphologique (macro et microscopique) des isolats de BL.

Les souches	Macromorphologie (colonies)	Micromorphologie
-------------	-----------------------------	------------------

7 Br(M)	Colonies rondes, crèmes.	Coccis en amàs
15 Vch(M)	Petites colonies blanches, rondes ou lenticulaires.	Petits bâtonnets isolés ou réunies en chaîne courtes.
20 Vch(M)	Colonies rondes, blanches.	Coccis diplocoques ou isolés.
30 Chv (M)	Colonies rondes, beiges.	Coccis diplocoques.
35 Vch (M)	Petites colonies blanches, rondes	Coccis, ovales, diplocoques.
37 An (G)	Petites colonies blanches, rondes.	Coccis, en tétrades.
38 Chv (M)	Petites colonies blanches, rondes.	Coccis, ovales, diplocoques.
39 Chv (M)	Petites colonies blanches, rondes.	Coccis, isolés et en amàs.
43 Chv (M)	Colonies transparentes, très petites, rondes.	Coccis isolés ou en chaînettes.
73 Inp ₃	Colonies rondes, beiges.	Coccis, en chaînette.
77 Inp ₃	Colonies rondes, jaunes.	Cocci diplocoque, et en tétrades
78 Inp ₄	Colonies rondes, crèmes.	Coccis en chaînette
1* Bt	colonies crème brillantes et bombées.	Coccis isolés
7* Chf	colonies crème très petites brillantes et élevées	Coccis isolés
10* Chf	colonies crème très petites brillantes et élevées	Coccis, en tétrades
20* Bt	Colonies transparentes, très petites, rondes	Coccis, en chaînette

1.5. Sélection de la souche à fort potentiel de production d'acide lactique

La seconde sélection a été faite sur le milieu lait écrémé en testant toutes les souches retenues après le criblage sur milieu Chalmers. L'évaluation a été basée sur les mesures d'acidité et du pH après 24 et 48h d'incubation. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 9-12.

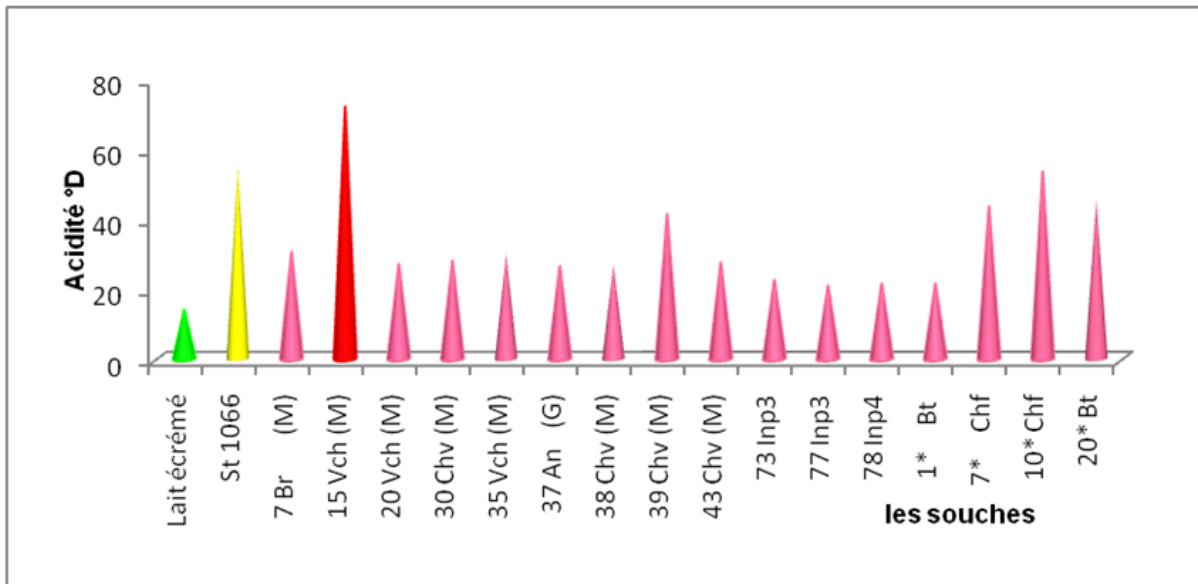


Figure 1.5.9 : Variation de l'acidité du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 24h d'incubation. St 1066 : souche de référence.

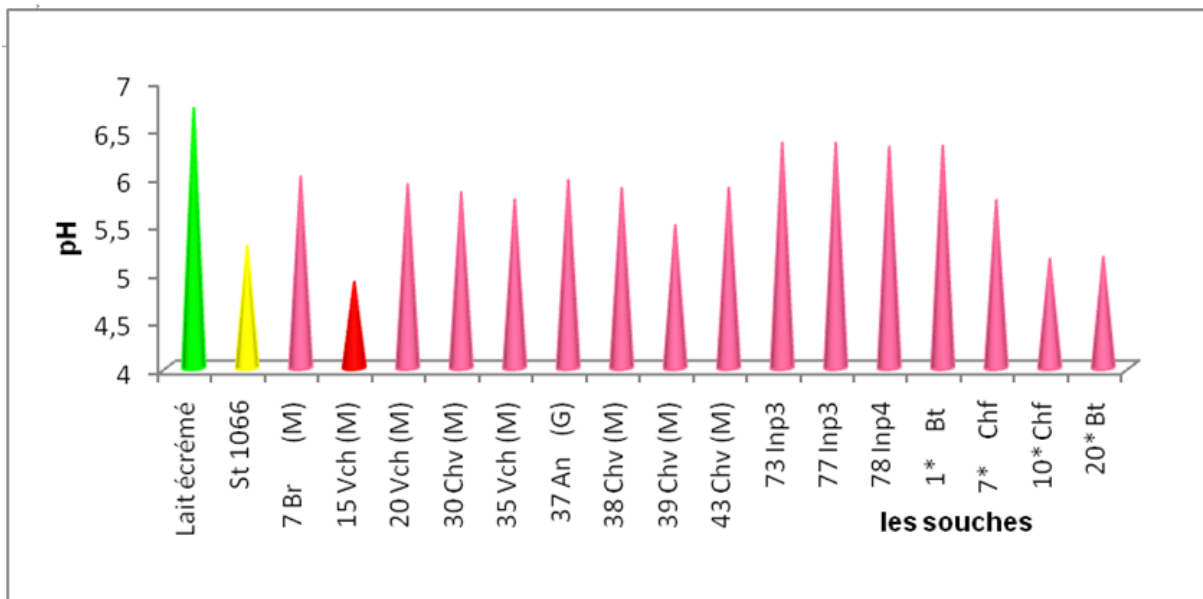


Figure 1.5.10 : Variation de pH du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 24h d'incubation.

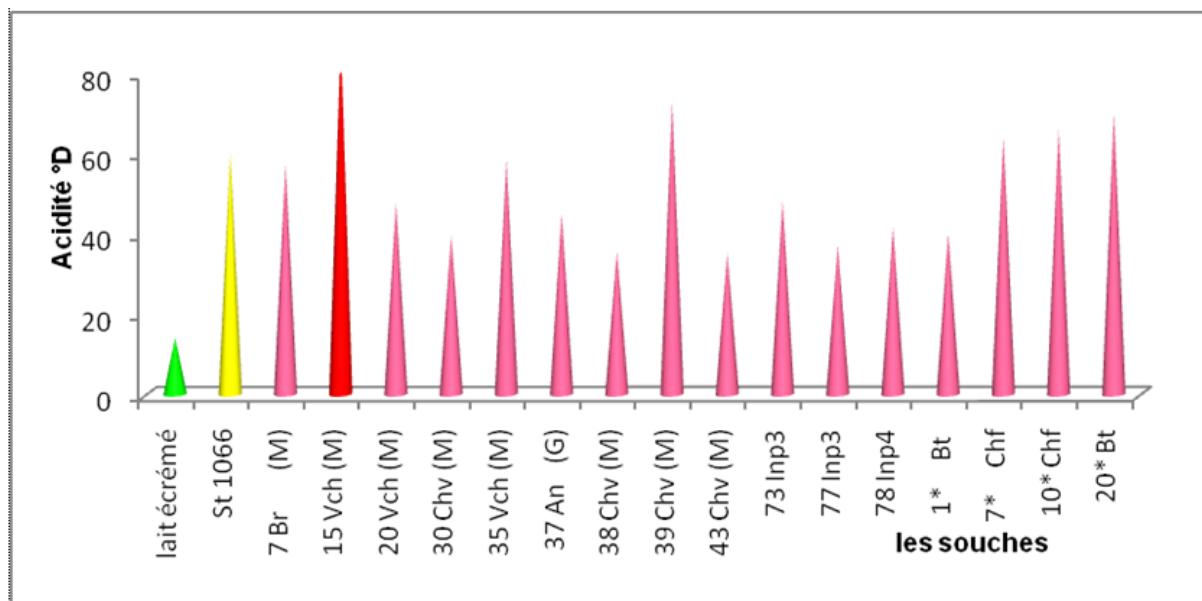


Figure 1.5.11 : Variation de l'acidité du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 48h d'incubation.

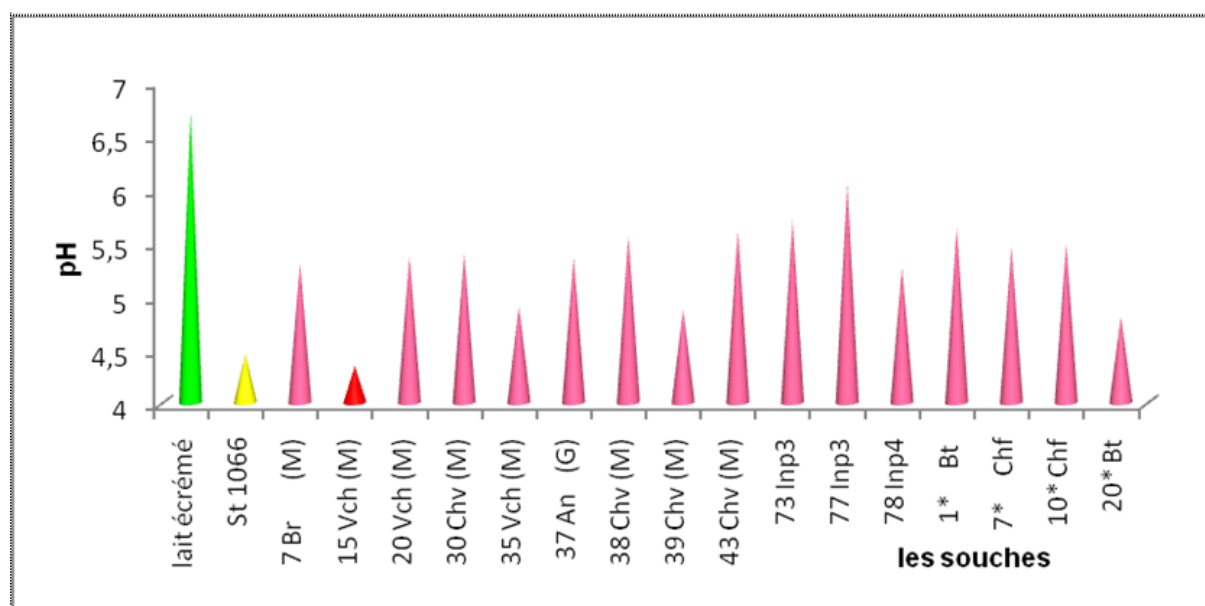


Figure 1.5.12 : Variation de pH du milieu LE ensemencé par les souches à sélectionner après 48h d'incubation.

Les **figures ci-dessus (9 – 12)** montrent une augmentation progressive de l'acidité avec une diminution remarquable du pH qui se diffèrent selon les isolats à sélectionner.

La souche 15 Vch(M) s'avère la plus performante, dont l'acidité prend les valeurs de **72** et **88,5 °D** accompagnée d'un pH de **4,89** et **4,34** après 24 et 48h, respectivement.

L'acidification du milieu pendant la croissance est liée à la dégradation des sucres [113], qui abaisse le pH en transformant le lactose en acide lactique (homofermentaire) ou en acide lactique, acide acétique et éthanol (hétérofermentaire). Cette acidification intervient comme facteur de coagulation du lait et de synthèse des caillés [15].

L'activité acidifiante est le critère primordial de sélection des BL [114]. En effet, l'aptitude acidifiante est caractéristique de chaque souche, car elle est liée aux aptitudes particulières qu'elle possède à dégrader les composés du milieu pour les rendre assimilables et à transporter les éléments nutritifs dans le cytoplasme. Aussi, les différences sont dues à l'existence d'une déficience de système de transport des substances nutritives ou/et des sucres fermentescibles [115].

Nous pouvons conclure après avoir comparé ces résultats que la souche 15Vch(M) se caractérise par sa forte capacité acidifiante et considérée la plus performante et donc elle est sélectionnée pour la poursuite de notre travail.

1.6. Identification de la souche performante 15Vch(M)

Seule la souche sélectionnée a été identifiée génotypiquement par la technique 16S. Les résultats du séquençage, l'ADN extrait de la souche et la taille du gène correspondante à l'ARN 16S, sont représentés ci-dessous (Tableau 16 et figures 13 et 14).

Séquençage complète du gène ARN 16S de la souche 15Vch(M) : 1511 bp

```
ATGGCTCAGGATTACCGCTACCGGGTCCCTAATACATGCAACTTGGACCAAGTCTGGTATTGATT
GGTGCTTGCACCATGTTTTCCATTTGAGTGAGTGCGAACAGTTGAGTAACACGTGGGAAACCTTC
CTAAAAGCGGGGGATAACACCTCGAAACAGAGGCTAATACCGCACAAACCCCTTGGACCGCATGGT
CCTACCATGAAAGATGGCTTGGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGCGTATTAGGTAGACGGCG
AGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGAG
TGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCT
GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCACGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAA
CATATCTGAGAACAACCTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGGGGAGCCACGGCTTACTACGTG
CCAGCAGCCGCGTAATACTTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
GGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGACCGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG
AACACCAGTGCGGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGC
AAACAGGATTTTATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTATCC
```

GCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGTATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGGGTAATTCGAAGCTACGCGAA
GAACCTTACCAGGACTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGG
ATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCCTGAACTGATATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATTAACAGTTGCCACCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGAGGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTTCACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAGCCTGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCG
GTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAAGCTGAAGTTGTATTAG

Similitude avec les souches de référence : Tableau 16.

Tableau 1.6.16 : Résultats de similitude avec les souches de référence.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN252881.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> partial 16S rRNA gene, strain TN635	2704	2704	99%	0.0	99%
AB362750.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 1829	2427	2427	99%	0.0	95%

Score = 2704 bits (1464), Expect = 0.0 ; Identities = 1495/1510 (99%), Gaps = 1/1510 (0%), Strand=Plus/Plu.

Tailles d'ADN chromosomique et du gène d'ARN 16S de la souche 15Vch(M) : Figures 13 et 14.

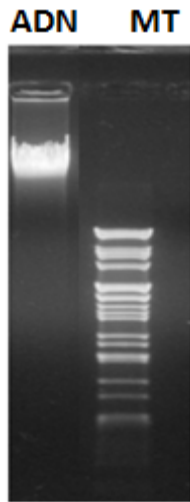


Figure 1.6.13 : Gel d'agarose (1% TBE/BET) montrant : ADNg de la souche 15Vch(M): la quantité d'ADN estimée à 500 ng dans 5 μ L de l'ADN extrait à partir de la souche 15. MT : Marqueur de taille.

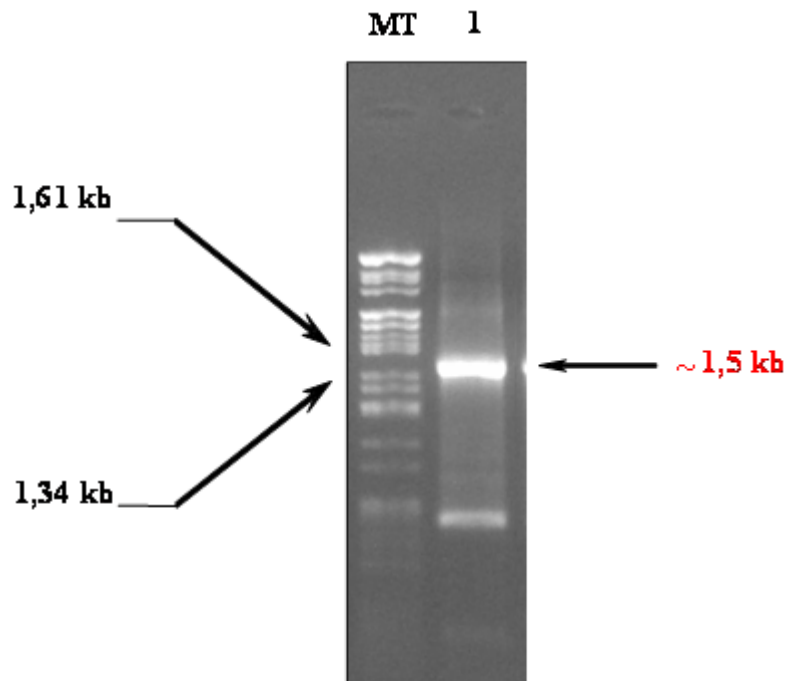


Figure 1.6.14: Gel d'agarose (1% TBE/BET). Taille du gene d'ARN 16S de la souche 15Vch(M) est estimée à environs 1,5 kb (piste 1). MT. Marqueur de taille (*HincII*).

D'après tous ces résultats notre souches 15Vch(M) est identifiée en tant *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch(M).

La souche sélectionnée est une *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch(M), elle est isolée à partir du trayon d'une vache allaitante, la morphologie de cette souche est bien claire sur les photos de la figure 15. C'est une BL qui appartient au groupe II des lactobacilles (hétérofermentaire facultative) [18]. La forme des isomères de l'acide lactique généralement produit par cette espèce est le DL [116]. (Voir le tableau 19 en annexe 5).

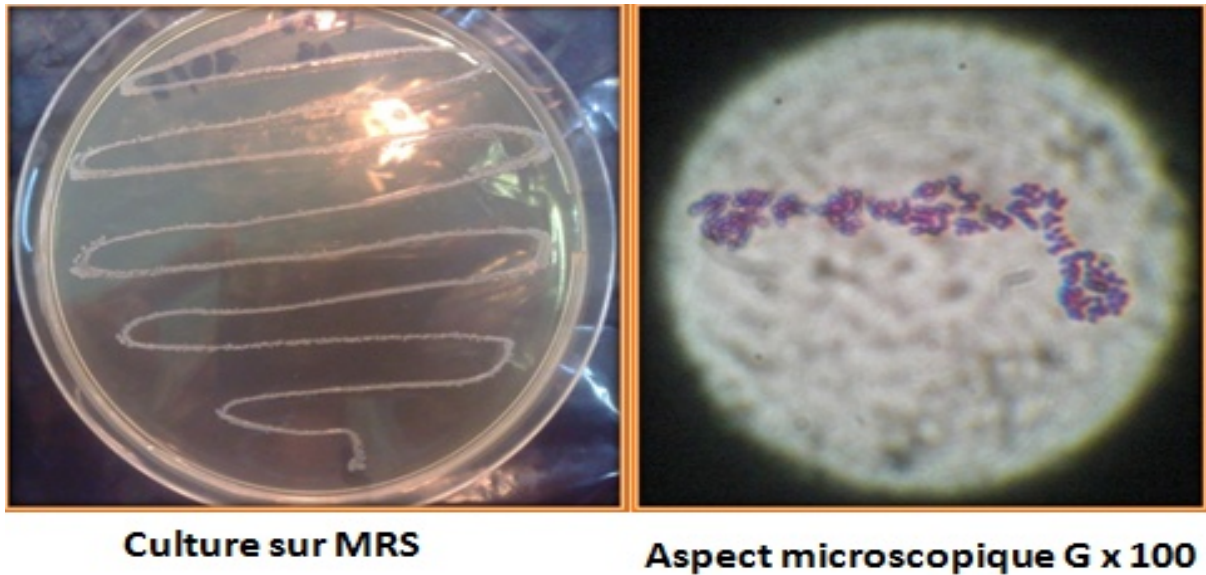


Figure 1.6.15 : La morphologie de la souche 15Vch(M). La culture sur milieu MRS après 24h d'incubation et la forme du germe après la coloration de Gram à Gx100.

Les souches appartiennent à cette espèce ont des cellules à forme bâtonnet large comme montre la photo de la figure 15.

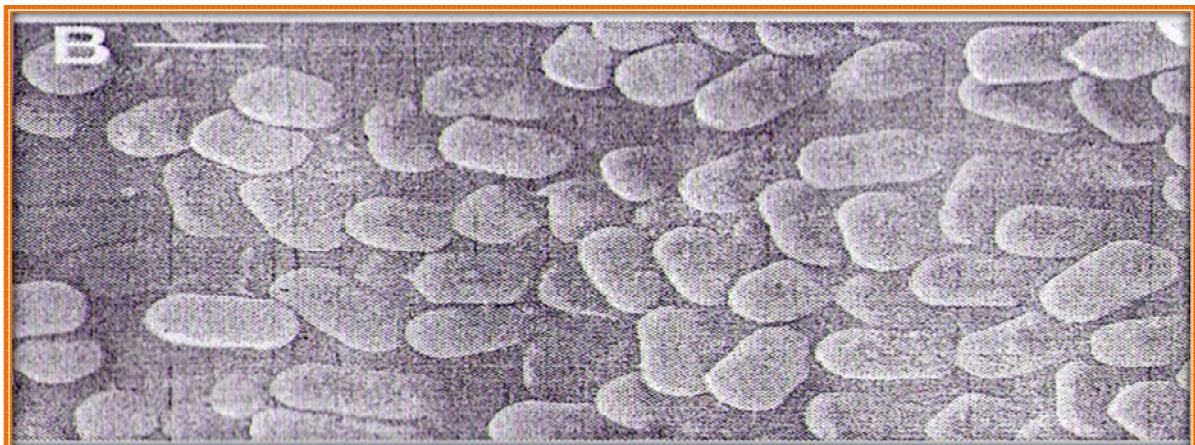


Figure 1.6.16: La forme d'une souche de *Lactobacillus plantarum* isolée par Dallaglio et al. (1994)[18]. Photographie par microscope électronique à ballayage.

Deuxième partie : Mise au point d'un milieu de culture optimisé pour la production de l'acide lactique.

2.1. Cinétique d'acidification de la souche *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch(M)

Nous avons essayé de remplacer le milieu LE par le LS doux qui constitue un milieu de choix pour les BL [117].

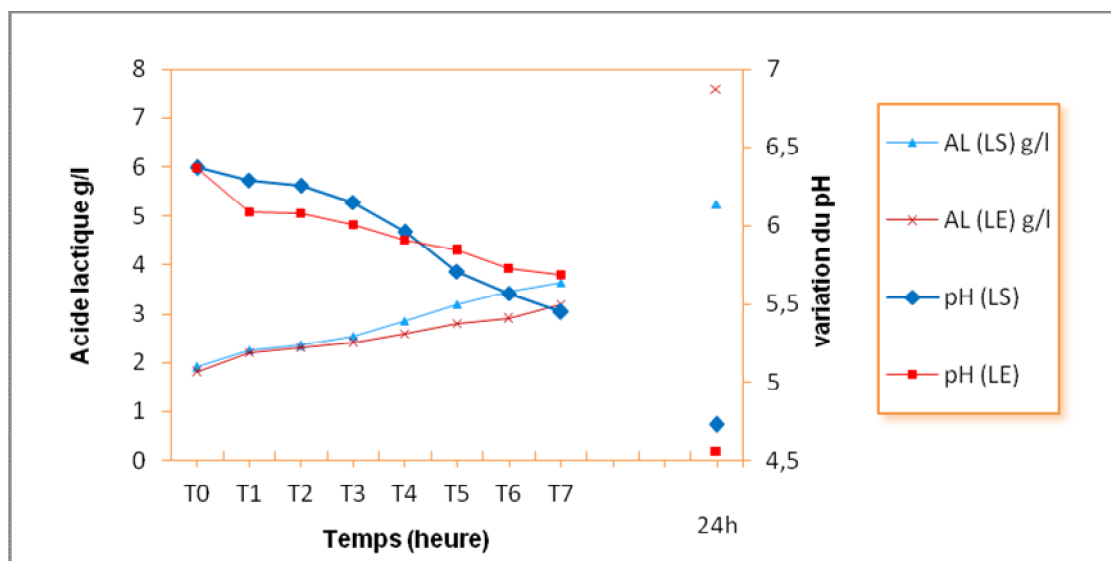


Figure 2.1.17 : Comparaison de l'activité acidifiante de la souche 15Vch(M) dans le LE et le LS. AL : acide lactique.

D'après la **figure 17** on constate que la production d'acide lactique en milieu LE atteint **7,60 g/l** avec un pH de **4,56**, par contre nous avons remarqué une diminution concernant la production d'acide lactique en milieu LS qui atteint **5,25 g/l** accompagnée d'un pH de **4,73** après 24h de fermentation.

Il paraît que cette diminution est attribuée à la composition du LS selon Luquet et Corrieu (2005)[118], la vitesse d'acidification dépend de la composition du milieu. Sa déficience en facteurs de croissance et en certains composés, fait que plusieurs chercheurs ont tenté de l'enrichir par l'addition de certains facteurs stimulants de la croissance tels que l'extrait de levure (EL), le Tween 80 et d'autres éléments [119].

2.2. Optimisations de la production d'acide lactique sur lactosérum doux

2.2.1. Effet de l'enrichissement par la matière sèche

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 18 et 19.

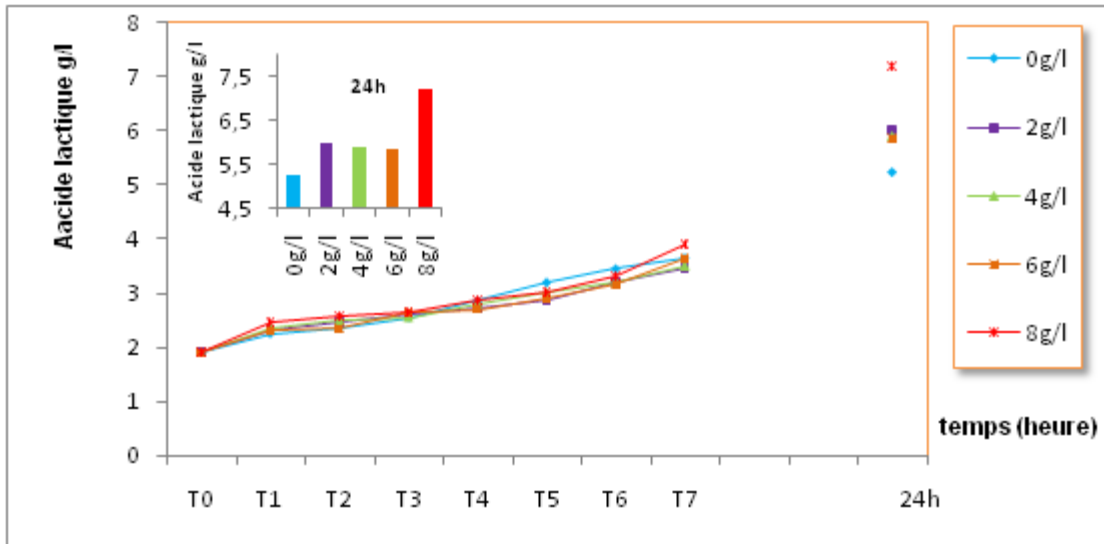


Figure 2.2.1.18: Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par la poudre du LE en fonction du temps.

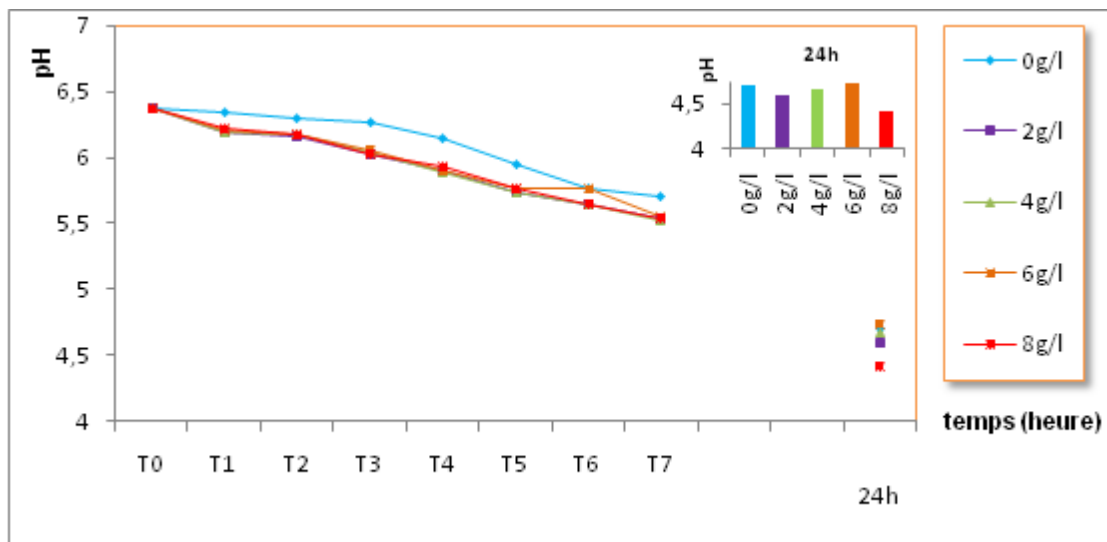


Figure 2.2.1.19: Evolution du pH du milieu LS enrichi par la poudre du LE en fonction du temps.

D'après les figures 18 et 19, on constate que la production d'acide lactique sur milieu LS est proportionnelle avec les différentes concentrations de la poudre de LE ajoutée (2 g/l, 4 g/l, 6 g/l et 8 g/l) ainsi une diminution du pH.

On remarque qu'à la concentration de **8 g/l** de la poudre de LE ajoutée, une production d'acide lactique atteint **7,2 g/l** avec un pH **4,42** est très proche à celle obtenue sur milieu LE seul qui est de **7,6 g/l** avec un pH de **4,56**. Sachant que dans le LS seul (**0 g/l**) on a marqué une faible production d'acide lactique qui prend la valeur de **5,25 g/l** et un pH de **4,73**.

Cette amélioration de l'acidification semble être liée à la présence de protéines dans le LE, Selon Marchall et Law (1984) [39] le lait et les produits laitiers sont des milieux riches en sources d'azote protéique et non protéique.

L'hydrolyse de protéines et d'oligopeptides de lait nécessite la présence de protéases et de peptidases bactériennes extracellulaires ou liées à l'enveloppe [2] ainsi selon El Soda et al. (1985)[120], la présence d'une protéase de paroi a été signalée chez *Lb. plantarum*.

Donc ces résultats nous permettent de déduire qu'on peut diminuer la quantité de la poudre de LE et la remplacer par la poudre du LS qui est cependant relativement moins coûteuse (FAO, 1995) [87], ainsi selon Vignola (2002)[82], les fournisseurs réintroduisent de plus en plus la poudre de LE dans les milieux commerciaux à base de LS pour améliorer l'activité des ferments.

2.2.2. Effet d'une supplémentation en source d'azote

2.2.2.1. Effet de l'extrait de levure

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 20 et 21.

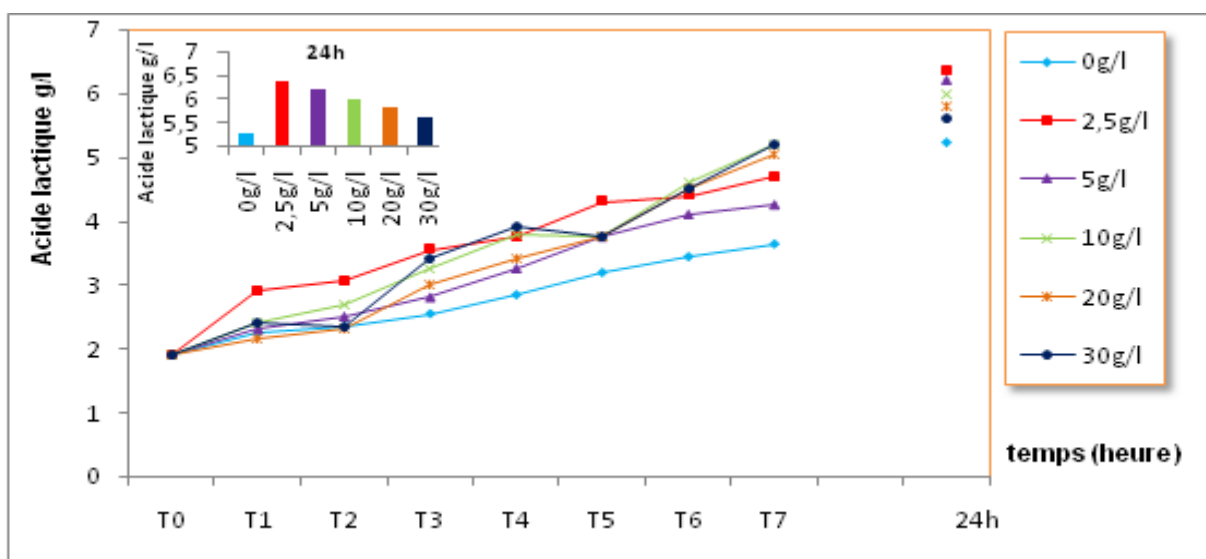


Figure 2.2.2.1.20 : Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par l'EL en fonction du temps.

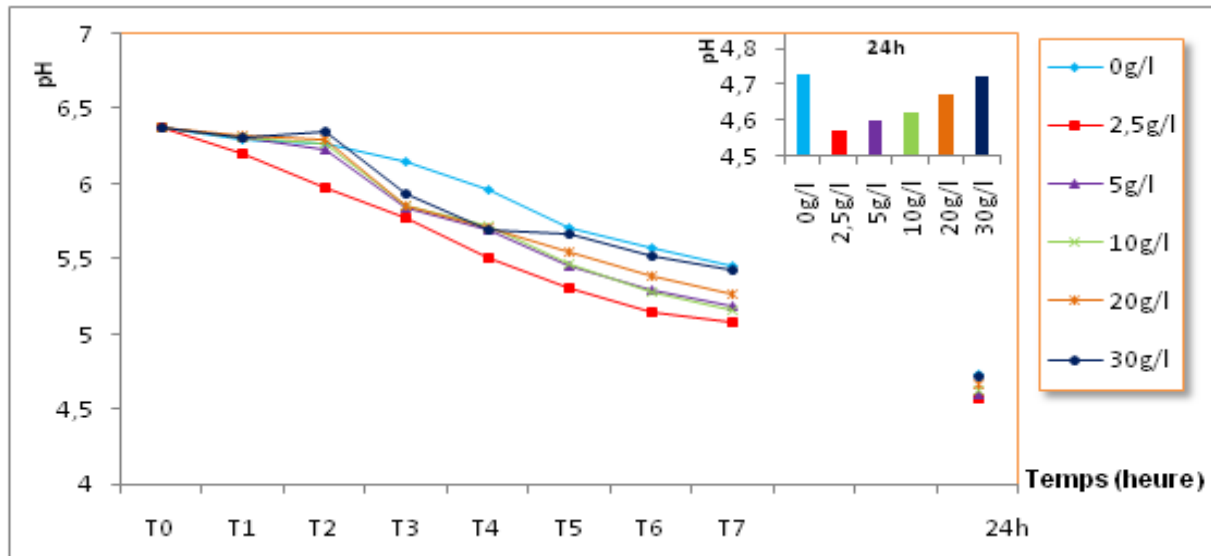


Figure 2.2.2.1.21 : Evolution du pH du milieu LS enrichi par l'EL en fonction du temps.

D'après les **figures 20** et **21** nous avons noté ce qui suit :

- Après 1 heure d'incubation on remarque que la concentration en acide lactique obtenu dans le milieu LS supplémenté par **5 g/l**, **10 g/l**, **20 g/l** et **30 g/l** d'EL demeure la même que celle du milieu non supplémenté, par contre on constate une amélioration pour le LS supplémenté par **2,5 g/l** d'EL. Parmi les paramètres alimentaires affectant la production fermentative d'acide lactique, l'EL mène aux concentrations les plus élevées en acide lactique en une série de source d'azote [121; 122], il stimule aussi la croissance des cellules bactériennes parce qu'il procure aux bactéries des vitamines, de l'azote, des acides aminés et du carbone qui sont des éléments importants pour le développement et la croissance bactérienne [123] (Voir tableau 20 en annexe 6).

- Après 24h d'incubation on remarque une meilleure production d'acide lactique à une concentration d'EL égale **2,5 g/l** tandis qu'il y a une diminution de production aux concentrations **5 g/l**, **10 g/l**, **20 g/l** et **30 g/l**. Ce ralentissement du taux de production peut être dû à une inhibition par un excès de supplément (EL). Levander et Radstron (2001)[124] ont attribué l'inhibition de la croissance et la production d'acide lactique à des concentrations d'EL au-dessus de **10 g/l**.

Amran (2000)[125] a travaillé sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus* cultivée sur lactosérum supplémenté par EL et il a conclu que les concentrations d'EL supérieures à **20 g/l** deviennent toxiques pour le microorganisme.

Donc, avec une concentration finale d'acide lactique de **6,35 g/l** et un **pH** de **4,57** nous retiendrons la concentration d'EL de **2,5 g/l** comme concentration optimale à la production d'acide lactique.

2.2.2.2. Effet du Corn Steep Liquor

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 22 et 23.

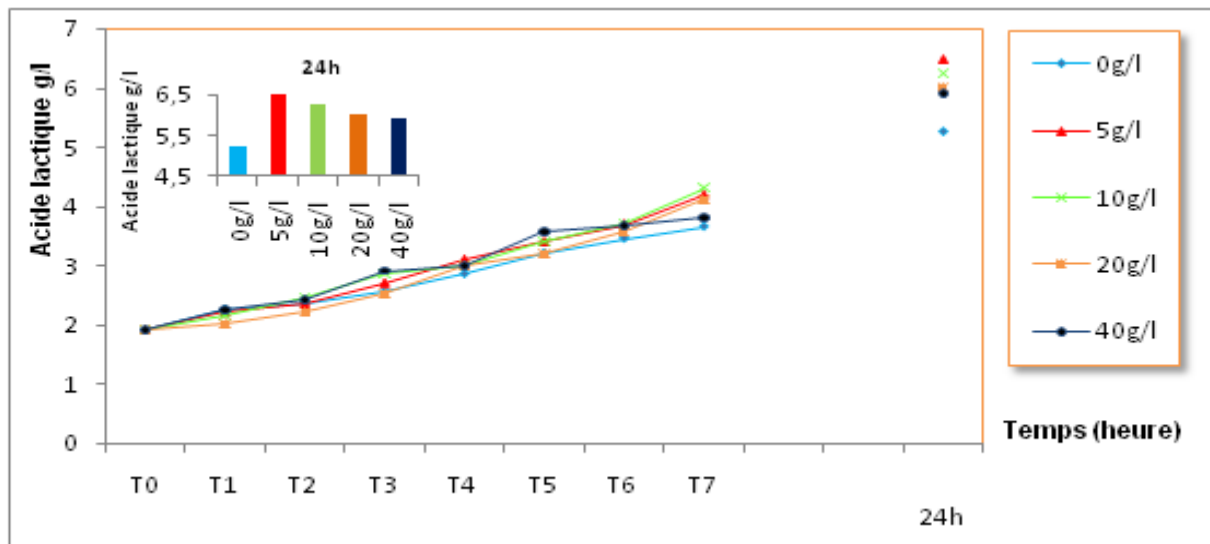


Figure 2.2.2.2.22 : Evolution de la concentration d'acide lactique dans le LS enrichi par CSL en fonction du temps.

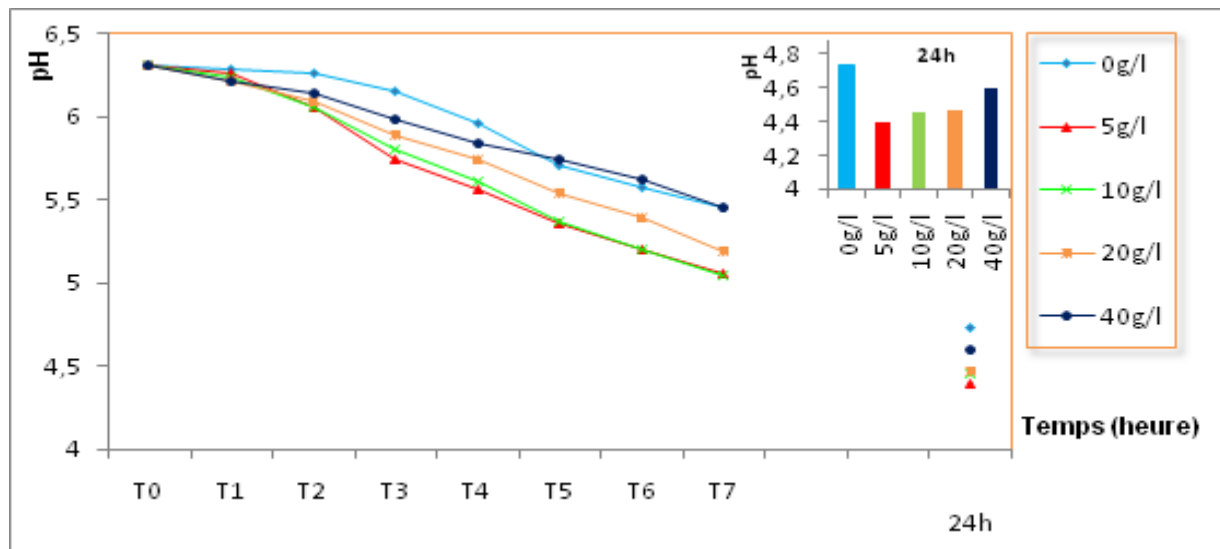


Figure 2.2.2.2.23 : Evolution du pH du milieu LS enrichi par CSL en fonction du temps.

D'après la **figure 22**, avec une concentration de CSL de **0 g/l** la production d'acide lactique est limitée, par contre l'adjonction de CSL au LS a eu un effet positif qui apparaît dès les 8 premières heures jusqu'à la fin de la fermentation. Cependant, un accroissement de la concentration en CSL de **5 g/l**, **10 g/l**, **20 g/l** et **40 g/l** a comme conséquence une diminution de cette même production qui prend les valeurs de **6,5 g/l**, **6,25 g/l**, **6,00g/l** et **5,90 g/l** respectivement après 24h d'incubation.

D'après la **figure 23**, à la fin des quatre fermentations, le pH baisse jusqu'à **4,39**, **4,45**, **4,47** et **4,60** pour des teneurs en CSL respectivement de **5 g/l**, **10 g/l**, **20 g/l** et **40 g/l**.

L'amélioration de la production d'acide lactique peut être attribuée à la disponibilité des acides aminés libres, des polypeptides et des vitamines. D'après Cardinal (1948)[126], le CSL est une excellente source d'azote pour la plupart des microorganismes parce qu'il est riche en acides aminés et polypeptides avec des quantités considérables de vitamines B complexes (Voir composition de CSL en annexe 6).

Le CSL est utilisé avec succès dans la production de l'éthanol par *Zymomonas mobilis* [127 ; 128], acide succinique par *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [129] ou pour la production d'arabinanase par *Fusarium oxysporum* [130], ou pour la production de la pinicilline G par *Penicillium notatum* [1] et d'acide L-lactique par *Lactobacillus delbrueckii* [131].

La diminution de la production d'acide lactique à des concentrations croissantes peut être due à la répression significative du carbone et d'azote [132].

Donc les **figures 19** et **20** montrent clairement que la concentration **5 g/l** a une meilleure production d'acide lactique (**6,5 g/l** avec un pH de **4,39**) comparée aux autres concentrations. Des résultats similaires ont été obtenus par Bustos et *al.* (2004)[133] quand ils ont travaillé sur l'optimisation de la production de D-acide lactique par *Lactobacillus coryniformis* en utilisant la méthode de réponse de surface.

La composition du LS supplémenté par **5 g/l** de CSL semble suffire aux besoins de *Lb. plantarum*, cette dernière espèce possède une carboxypeptidase spécifique capable de libérer l'arginine située dans des peptides en position COOH-terminale. Ce type d'enzyme très rarement présent chez les bactéries, a été séparé (à partir de la fraction soluble d'un broyat cellulaire) d'une aminopeptidase et d'une dipeptidase par chromatographie d'affinité [67].

2.2.2.3. Comparaison entre les deux sources d'azote

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 24 et 25.

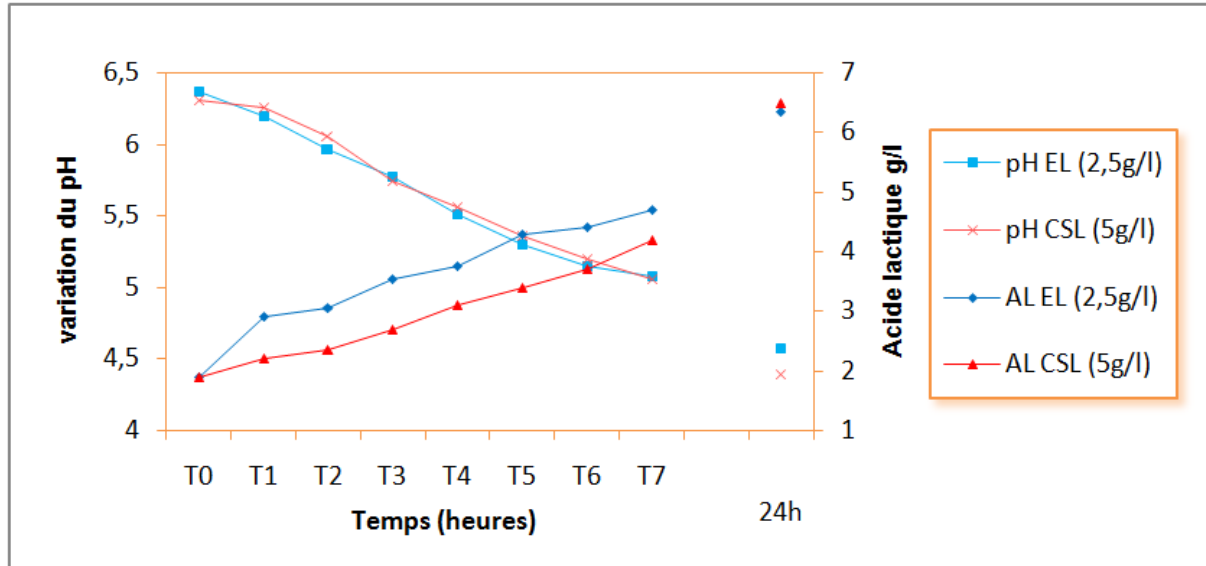


Figure 2.2.2.3.24: Comparaison de l'évolution de la production d'acide lactique, du pH, de la consommation du lactose et de la biomasse dans un milieu de LS supplémenté par l'EL (2,5g/l) et un autre par CSL (5g/l) après 24h d'incubation.

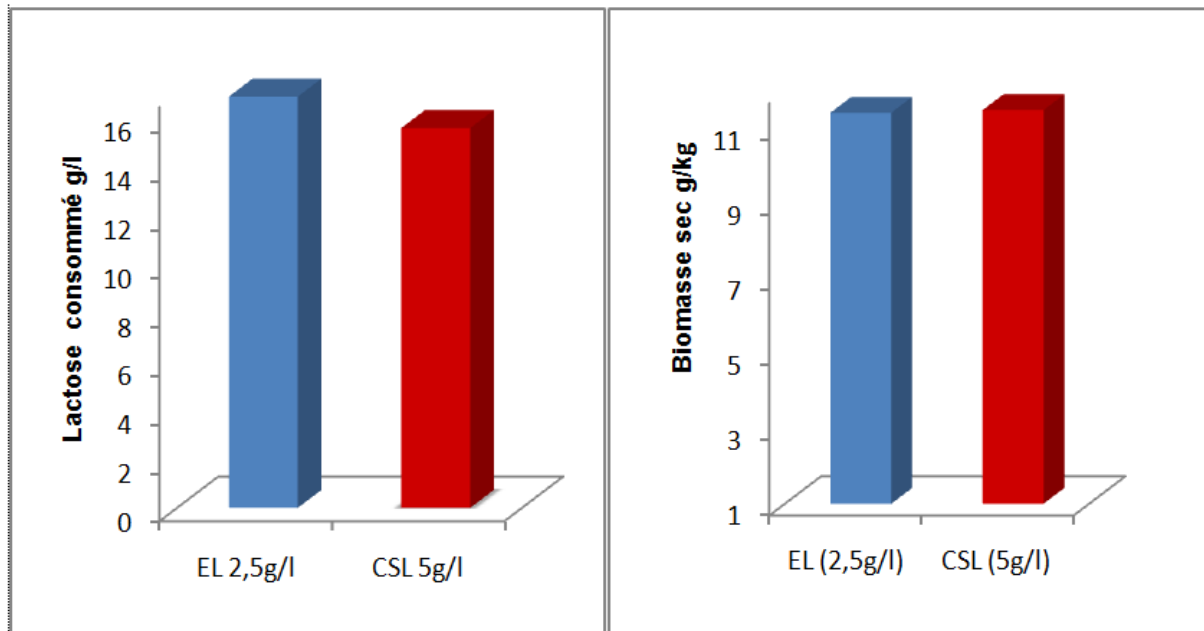


Figure 2.2.2.3.25: Comparaison entre l'effet d'EL et CSL en tant que sources d'azote en tenant compte le lactose consommé et la production de la biomasse sèche dans les deux milieux.

La comparaison des deux cinétiques et les histogrammes montre bien que *Lb. plantarum* 15Vch(M) se comporte d'une façon presque similaire pour :

- La production d'acide lactique, dont cette dernière atteint **6,5 g/l** dans le LS supplémenté par **5 g/l** de CSL et **6,35 g/l** dans LS supplémenté par **2,5 g/l** d'EL.
- Le pH qui atteint **4,39** dans le LS supplémenté par **5 g/l** de CSL et **4,57** dans LS supplémenté par **2,5g/l** d'EL.
- La biomasse prend la valeur de **11,5 g/kg** dans le milieu LS supplémenté par **5 g/l** de CSL et **11,43 g/kg** dans le milieu LS supplémenté par **2,5 g/l** d'EL.

Par contre la consommation du lactose dans le LS supplémenté par l'EL est plus importante que celle dans le LS supplémenté par CSL avec une différence de **1 g/l**. Cette différence peut être due à la consommation d'autres sucres présents dans le CSL autre que le lactose. Donc on peut substituer **2,5 g/l** d'EL par **5 g/l** de CSL.

De nouveaux milieux peu coûteux pour la fermentation lactique sont souhaitables afin de diminuer le coût de production, sachant que le coût élevé de l'EL altère les sciences

économiques de la fermentation d'acide lactique parce qu'on estime qu'il représente environ 38% de tout le coût de production [134]. Du point de vue économique, il pourrait être intéressant de substituer les composants partiellement chers (comme l'EL) des milieux généraux de lactobacilles par CSL.

2.2.3. Effet du Tween 80

Les résultats obtenus sont présentés au niveau de la figure 26.

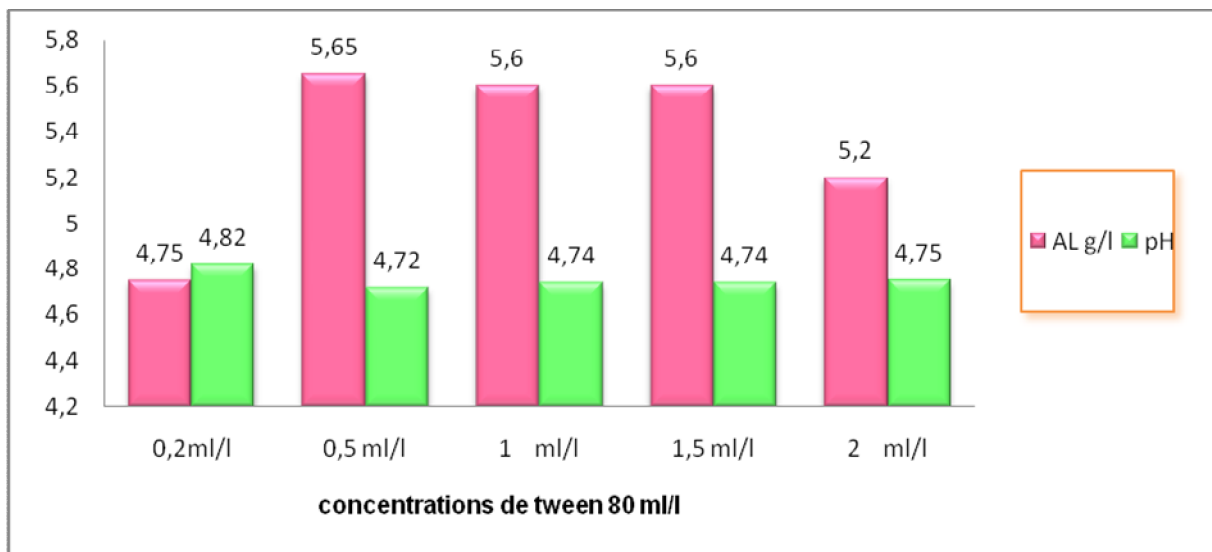


Figure 2.2.3.26: Effet de Tween 80 sur la production d'acide lactique et la variation du pH.

Lorsqu'on supplémente le LS par différentes concentrations de Tween 80, on ne constate pas une amélioration considérable pour la production d'acide lactique.

Selon Naveena et *al.* (2005)[135] le Tween 80 permettrait d'augmenter le transfert des glucides à travers la membrane cellulaire et ainsi permettrait d'augmenter la production d'acide lactique et d'enzymes.

Donc le Tween 80 ne joue pas **vraiment** un rôle essentiel sur la production d'acide lactique pour la souche *Lb. plantarum* 15Vch(M) comme rapporté Chauhan et *al.* (2005)[136] que le Tween 80 a un effet négatif sur la production d'acide lactique. Ceci pourrait être dû au fait que la souche utilisée a eu facilement les sucres réducteurs disponibles.

2.2.4. Effet des sels minéraux

Les résultats obtenus sont présentés au niveau des figures 27 et 28.

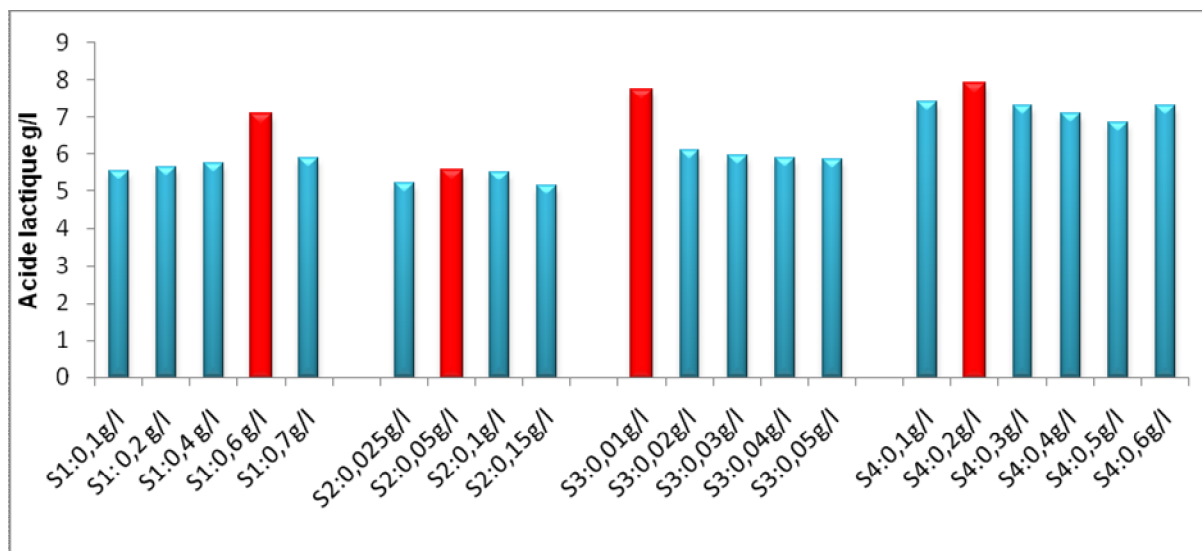


Figure 2.2.4.27 : Effet des sels minéraux sur la production d'acide lactique dans le LS supplémenté par différentes concentrations des sels minéraux. (S1 : LS+ MgSO₄. S2 : LS+ MnSO₄. S3 : LS+ FeSO₄. S4 : LS+KH₂PO₄.)

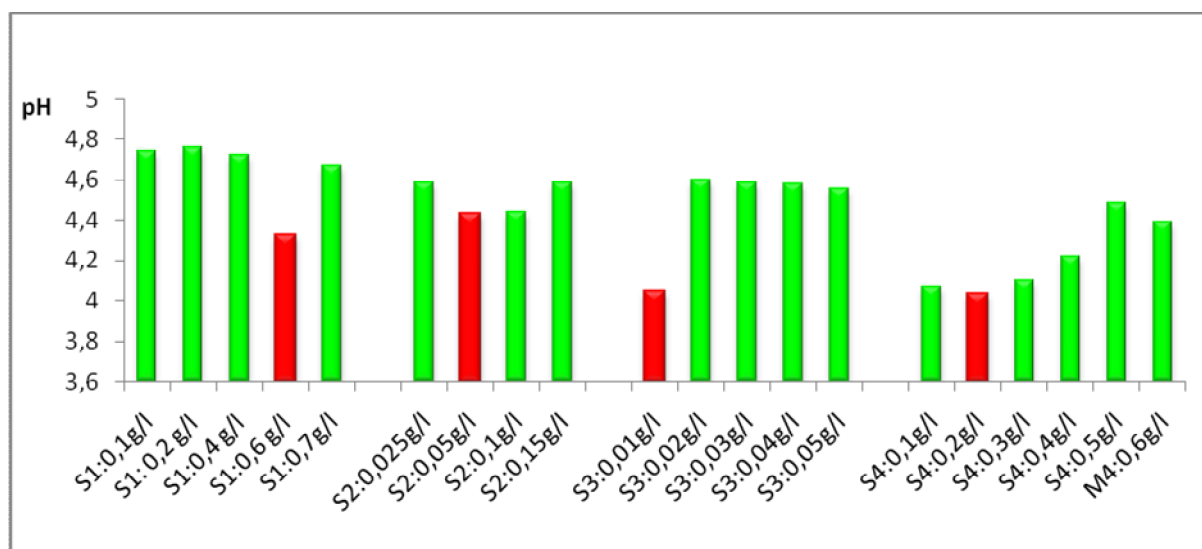


Figure 2.4.28 : Effet des sels minéraux sur la variation du pH du LS supplémenté par différentes concentrations des sels minéraux. (S1 : LS+ MgSO₄. S2 : LS+ MnSO₄. S3 : LS+ FeSO₄. S4: LS+KH₂PO₄.)

D'après l'analyse des résultats précédents, on constate que la production d'acide lactique par *Lb. plantarum* 15Vch(M) est considérablement stimulée en présence de MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄ et KH₂PO₄.

Les figures 27 et 28 font ressortir que :

Les concentrations **0,6 g/l**, **0,05 g/l**, **0,01 g/l**, et **0,2 g/l** de **MgSO₄**, **MnSO₄**, **FeSO₄** et **KH₂PO₄** respectivement, ont eu des effets positifs sur la production d'acide lactique, dont les concentrations en acide lactique produites dans le milieu atteignent : **7,05 g/l**, **5,55 g/l**, **7,7 g/l** et **7,9 g/l** accompagnées d'un pH de : **4,32**, **4,43**, **4,04** et **4,03**, respectivement. Au-dessus de ces concentrations on remarque une diminution de la production d'acide lactique.

Selon Givry (2006)[137], les voies métaboliques des souches, et plus particulièrement les enzymes, nécessitent en général la présence de cofacteurs tels que les ions. Desmazeud et De Roissart, (1994)[38] ont montré que pour assurer le bon déroulement du métabolisme des BL, elles ont selon l'espèce, besoin de Mn²⁺, Mg²⁺, Mo⁴⁺, Se⁴⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ ou Fe³⁺.

Il a été montré que les ions Mg²⁺ et Mn²⁺ (De Man et *al.*, 1960) ou Fe²⁺ (Ledesma et *al.*, 1977)[138] pouvaient intervenir dans la nutrition des lactobacilles.

Chez les souches de *Lb. plantarum*, les ions Mn²⁺ trouvés en fortes concentrations sont associés à des polyphosphates de haut poids moléculaire, qui interviendraient comme système de régulation dans la résistance de bactérie à l'oxygène [139].

La diminution peut être justifiée par une inhibition de la croissance de notre souche. Ceci est en accord avec plusieurs travaux, notamment ceux de Majorella et *al.* (1983) [110] qui ont montré que la présence d'éléments minéraux en excès inhibe la croissance du microorganisme.

2.2.5. Milieu adéquat à la production d'acide lactique par la souche 15Vch(M)

Après avoir procédé à la détermination des meilleurs taux de suppléments en différents ingrédients, les milieux **M1**, **M2**, **M3** et **M4** ont été testés pour déterminer le milieu le moins coûteux et le plus adapté à la production de l'acide lactique par la souche *Lb. plantarum* 15Vch (M).

- Milieux testés :

M1: Milieu LS + EL (2.5g/l) + MgSO₄ (0,6 g/l) + FeSO₄ (0,01g/l) + KH₂PO₄ (0,2g/l).

M2: Milieu LS + CSL (5g/l) + MgSO₄ (0,6 g/l) + FeSO₄ (0,01g/l) + KH₂PO₄ (0,2g/l).

M3: Milieu LS + CSL (2.5g/l) + EL (1.25g/l) + MgSO₄ (0,6 g/l) + FeSO₄ (0,01g/l) + KH₂PO₄ (0,2g/l).

M4 : Milieu LS + CSL (5g/l) + KH_2PO_4 (0,2g/l).

Les résultats obtenus sont graphiquement représentés dans la figure 29.

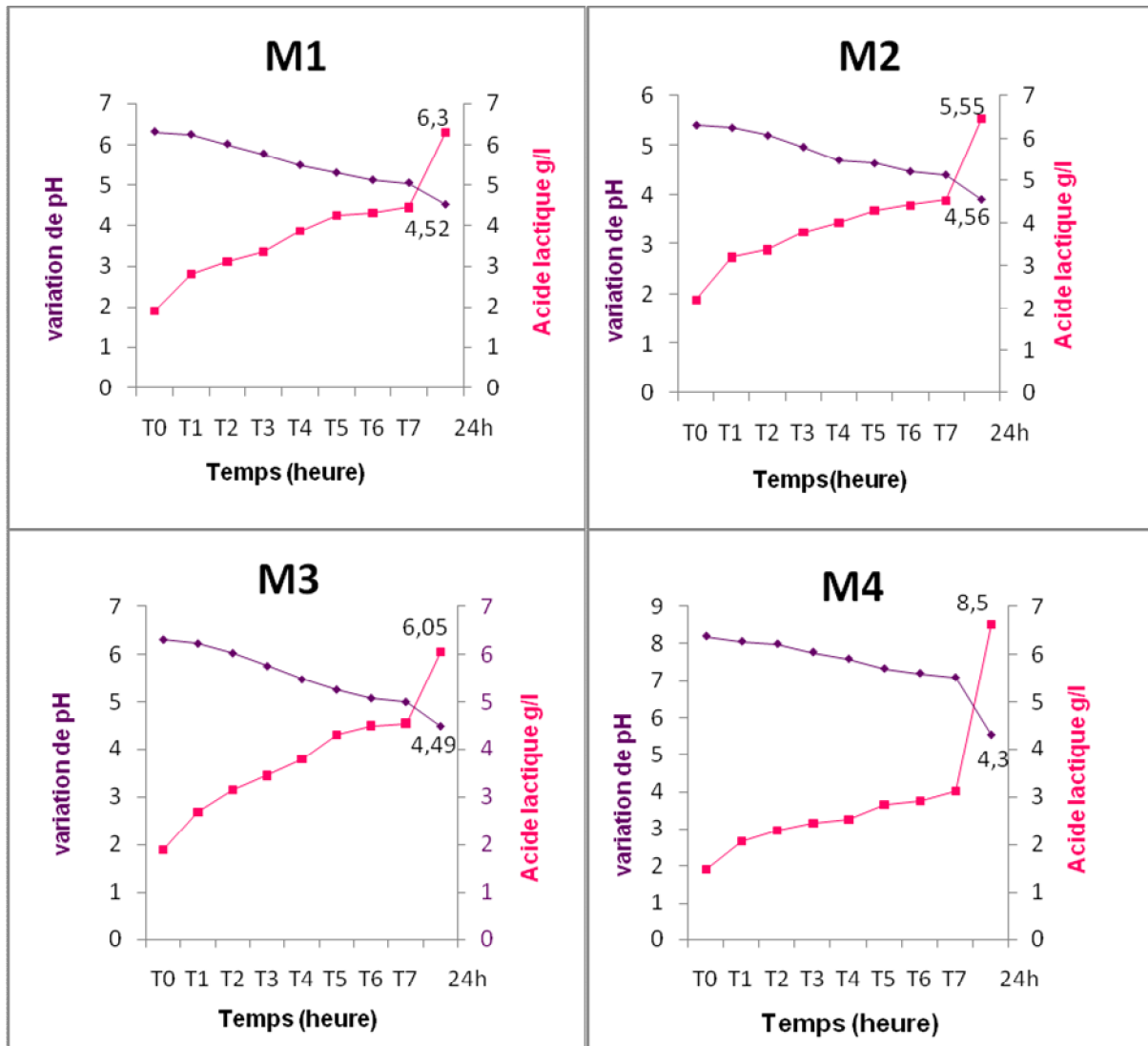


Figure 2.5.29 : Evolution du pH et de la production d'acide lactique dans les milieux de culture : **M1**, **M2**, **M3** et **M4** ensemencés par *Lb. plantarum* 15Vch (M) en fonction du temps.

La **figure 29** nous a permis de déduire que :

- Dans le milieu **M1** ; l'addition des sels minéraux n'a pas un effet considérable sur la production d'acide lactique qui prend la valeur de **6,3 g/l** avec un pH de **4,52** sachant que le LS supplémenté par **2,5 g/l** d'EL seul prend la valeur de **6,35 g/l** avec un pH de **4,57**.

- Dans le milieu **M2** ; il ya une diminution de production d'acide lactique de **6,5 g/l** à **5,55 g/l** quand on ajoute les sels minéraux au LS supplémenté par **5 g/l** de CSL. Cette diminution peut être justifiée par la présence de ces sels dans le CSL, selon Zabriskie et *al.* (1982)[141] le

CSL contient comme sels : K, P, Mg, Ca, S, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Mo, Se, Co, qui mènent selon Eck et Gillis (1997)[140] aux concentrations non optimales pour notre souche.

- Ces résultats peuvent être confirmés lorsqu'on minimise la concentration de CSL (**2,5 g/l**) dans le milieu **M3** où la production d'acide lactique s'améliore par rapport à celle obtenue dans le milieu **M2**. Cette utilisation non optimale des nutriments affecte la coopération entre l'EL et le CSL qui normalement selon Oh et *al.* (2005) [142], la combinaison améliore de manière significative la croissance et la production de l'acide lactique.

- La production d'acide lactique est importante dans le milieu **M4**, elle atteint **8,5 g/l** avec un pH de **4,30**, cela peut être expliqué par l'effet tampon de **KH₂PO₄**. D'après Perry et *al.* (2004)[143], l'addition de sels de phosphate (PO₄) permet à la fois de satisfaire les besoins des microorganismes pour cet élément et de tamponner le milieu de culture afin d'éviter des variations significatives du pH au cours de la croissance.

Troisième partie : Production d'exopolysaccharides à base du lactosérum doux

Le substrat de la fermentation choisi est à base de lactosérum doux, qui est un sous-produit de l'industrie laitière. Il contient le quasi totalité du lactose de lait. Dans les industries laitières le lactosérum est souvent rejeté en quantité importante dans l'environnement sans être traité, présentant ainsi une source importante de pollution. D'un autre côté richesse d'éléments nutritifs, il présente une excellente source de carbone et de minéraux pourrait utilisable pour la fermentation des bactéries lactiques.

A partir de ces données nous avons essayé de revalorisé ce rejet industriel, en l'utilisant comme un milieu favorable pour la production des exopolysaccharides. La souche utilisée est une souche épaississante connue par la production d'exopolysaccharides obtenue à partir du laboratoire de Génétique Microbienne. INRA–CRJ. 78352 Jouy en Josas cedex (France).

Le lactosérum a été choisi comme support d'étude dans notre cas pour trois raisons dont la plus justifiante est liée à sa composition peu variée et parfaitement connue. Enfin, réduit sous forme de poudre, il est facilement transportable et peut facilement être reconstitué au

3.1 Effet du milieu de culture sur la production des exopolysaccharides

3.2 Evolution du pH pour les différents milieux de cultures

Les résultats obtenus concernant l'évolution du pH sont présentés au niveau de la figure 30.

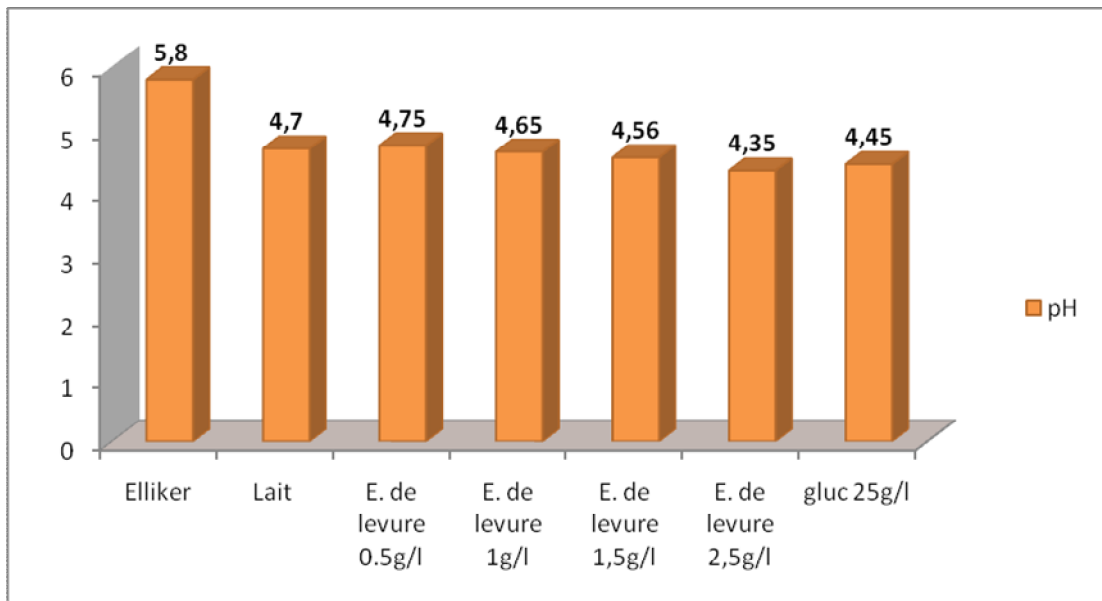


Figure 3.2.30 : Variation du pH en fonction de différents milieux utilisés pour la production d'EPS.

Le milieu Elliker est considéré comme étant une culture témoin par rapport aux autres milieux de culture, à savoir lait écrémé, lait écrémé enrichie à différentes concentrations d'extrait de levure (apport d'azote) et lait enrichie de glucose (apport de carbone). La diminution de pH entre le témoin et le lait est traduite par la coagulation des caséines du lait.

Nous remarquons que le pH diminue par rapport le lait écrémé et ceux des milieux enrichis pour atteindre une valeur de 4,35 avec la concentration de 2.5 g/l de l'extrait de levure. Ceci témoigne le bon déroulement de la fermentation et donc, la croissance bactérienne.

3.2.1 Evolution de la viscosité de la culture effectuée des différents milieux

Les résultats obtenus concernant l'évolution de la viscosité sont présentés au niveau de la figure 31.

La viscosité étant un paramètre pouvant varier avec la nature du milieu de culture. A cet effet l'évolution de la viscosité dans les différents milieux de culture a été suivie pour une température d'incubation de 42 °C.

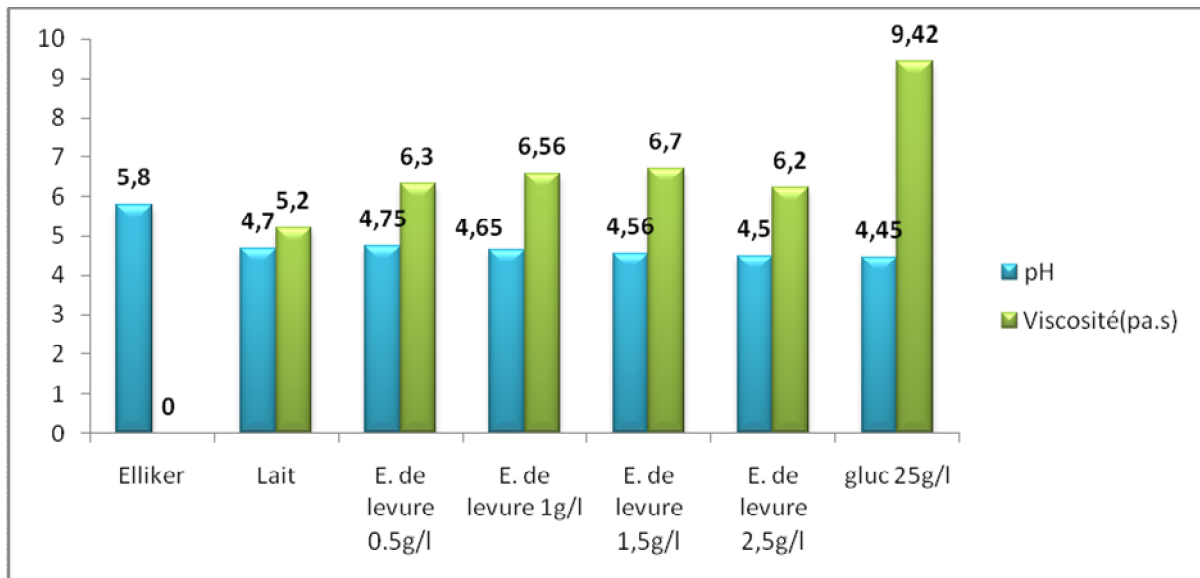


Figure 3.2.31 : Evolution de la viscosité et du pH en fonction de différents milieux.

Le milieu est devenu très visqueux en présence du glucose. La consistance du milieu de culture est un bon indicateur pour la production d'EPS par les BL.

3.3.1 Evolution de la quantité des exopolysaccharides produite dans les différents milieux

Le milieu Elliker est considéré comme témoin négatif et le milieu LER comme témoin positif pour la production des EPS [53]. Les résultats obtenus concernant l'évolution de la production d'EPS sont présentés au niveau de la figure 32.

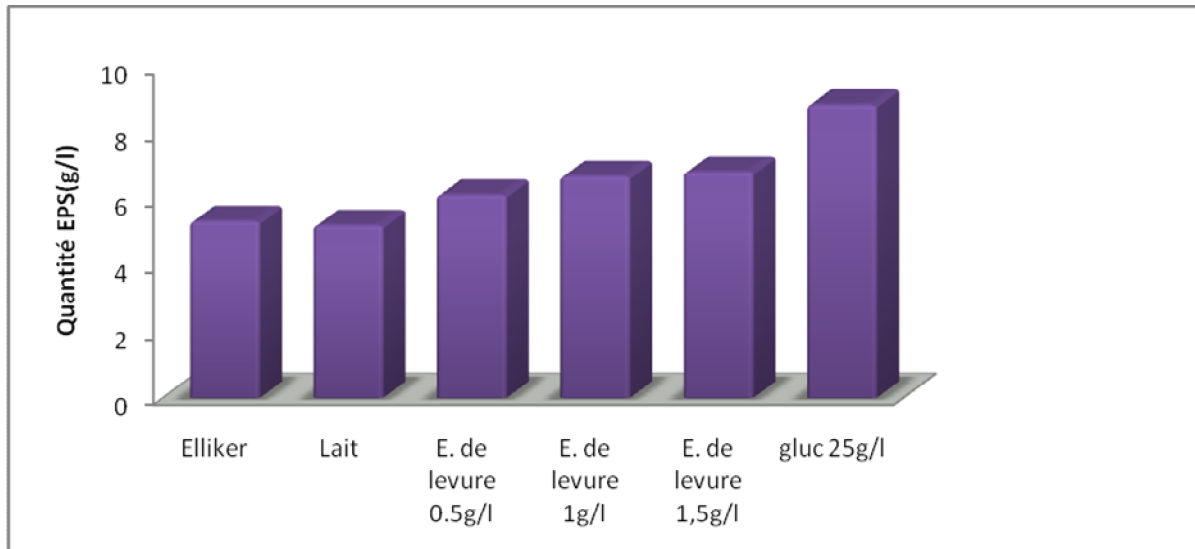


Figure 3.3.32 : Teneur en EPS en fonction des différents milieux utilisés.

La souche *St. thermophilus* 1066 a produit la majorité de l'EPS pendant la phase exponentielle de croissance avec une meilleure production en présence du glucose utilisé comme source d'énergie et de carbone. Lorsque cette souche croissait en présence du glucose, une fraction de l'UDP-glucose et de l'UDP-galactose générée par les enzymes de la voie de Leloir est essentielle pour la production d'EPS comme rapportés par plusieurs auteurs [124, 146].

En utilisant deux milieux essentiels pour la production d'EPS : Lait écrémé et LS additionné avec l'extrait de levure. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 33 et 34.

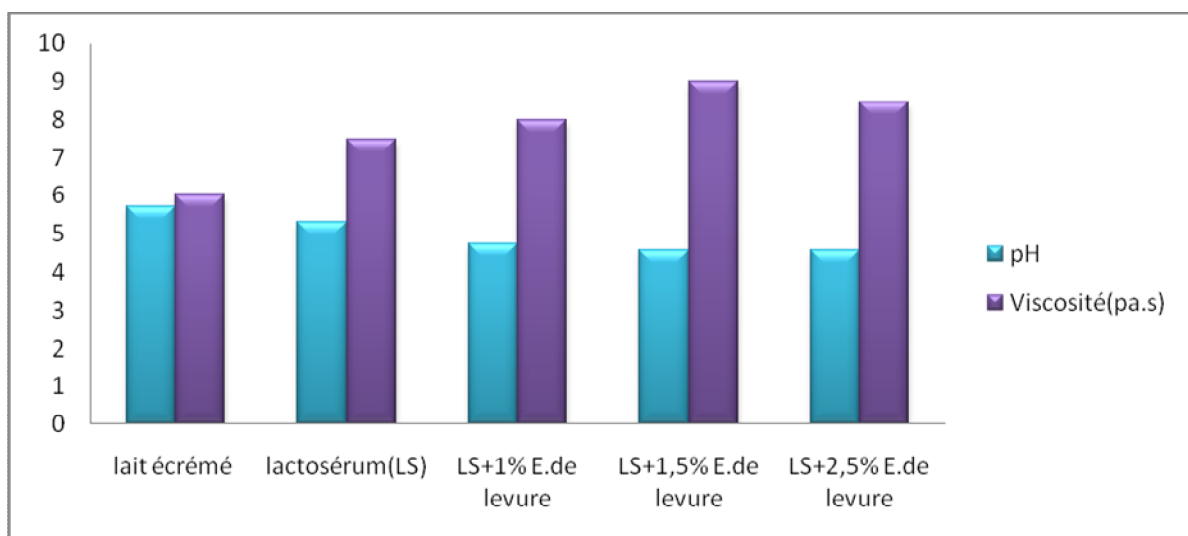


Figure 3.3.33 : Evolution de la viscosité et du pH en fonction de lactosérum supplémenté.

Simultanément, nous avons constaté que la meilleure production a été obtenue quand le milieu était supplémenté avec 1.5 g/l d'extrait de levure. De plus, la viscosité du milieu était la plus élevée avec 8.54 pa.s

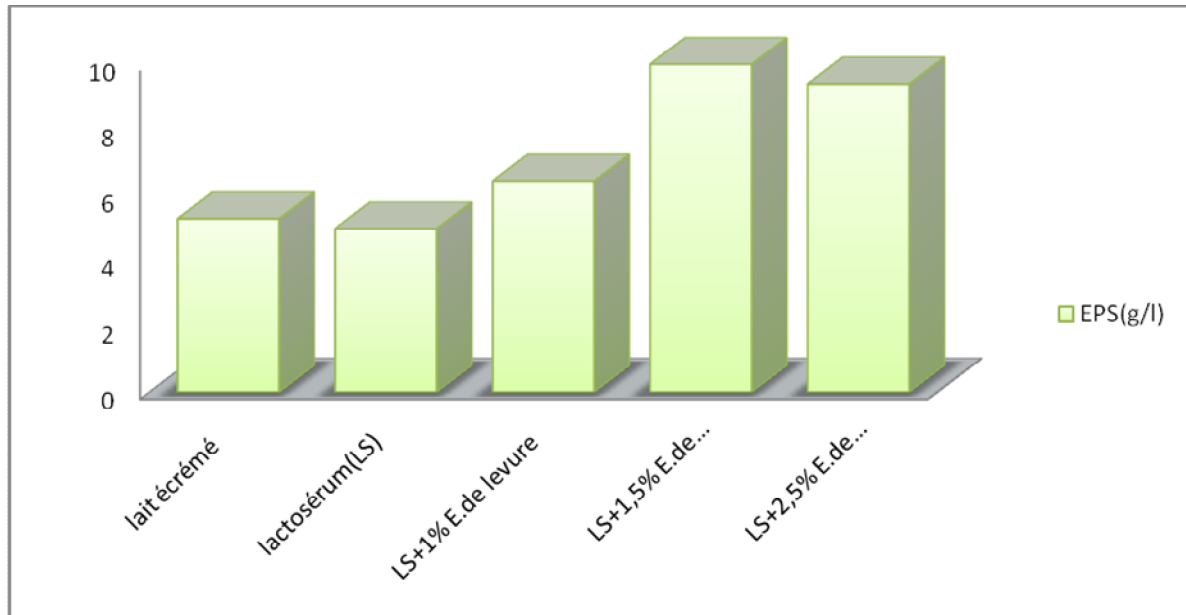


Figure 3.3.34 : Teneur en EPS en fonction de lactosérum supplémenté.

La comparaison de nos résultats de cette partie avec ceux obtenus dans des travaux similaires, nous pouvons enregistrer les points suivants :

- Avec un pH fixe, la production d'EPS est augmentée lors d'un bon déroulement de la fermentation et ceci est confirmé par la mesure de la viscosité dont les meilleurs taux sont obtenus dans un milieu enrichi par l'extrait de levure (1.5 g/l) comme signalés par Gassem et al. [151].
- D'après les auteurs : Mozzi et al. [152; 153] ; Gamar-Nourami et al., 1998 [154]; Grobber et al., 1998 [155]; Petry et al., 2000 [156], le pH optimum pour la production d'EPS est généralement proche de celui pour la croissance.
- Lors des fermentations à pH 6.5 et à 42 °C en utilisant le lactosérum supplémenté avec de l'extrait de levure et de glucose, une production maximale d'EPS a été mesurée par la méthode conventionnelle et confirmée par la mesure de la viscosité.

- Il a donc possible de produire les exopolysaccharides dans lactosérum doux à un taux allant de 6 à 10 g/l avec la souche *Streptococcus thermophilus* 1066. Des résultats proches ont été obtenus avec la même souche dite épaississante [46 ; 157 ; 158].

En effet, un polysaccharide non chargé se dissout plus facilement dans le lactosérum et interagit moins facilement avec les caséines chargées positivement ; il augmentera la viscosité du produit tout en se montrant peu efficace pour améliorer l'élasticité du produit [159.160].

CONCLUSION

Notre étude a comme but d'une part, l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques (BL) à partir de différentes niches écologiques locales et la sélection d'une souche à fort potentiel technologique (acidifiante). D'autre part, la revalorisation du lactosérum doux afin de produire de l'acide lactique et les exopolysaccharides, d'intérêt alimentaire et textuel, respectivement.

Parmi les principaux résultats obtenus concernant l'isolement et le criblage, nous pouvons noter que:

- 16 souches sont considérées comme BL après les avoir isolées sélectivement et testées sur milieu Chalmers.
- La souche 15Vch(M) étant la meilleure pour la production d'acide lactique sur milieu lait écrémé.
- L'identification génotypique indique que la souche 15Vch(M) appartient au genre *Lactobacillus* comme espèce : *Lactobacillus plantarum* strain 15Vch(M).

D'après les résultats d'optimisation des paramètres liés au milieu de culture nous avons conclu que :

- On peut diminuer la quantité de la poudre de lait écrémé par l'ajout de **8 g/l** de cette dernière au lactosérum doux reconstitué à 10 % (P/V).
- L'adjonction de suppléments (source d'azote, sels minéraux) au milieu de culture s'est révélée nécessaire pour une meilleure production d'acide lactique.
- On peut substituer **2,5 g/l** d'extrait de levure (source d'azote onéreuse) par **5 g/l** de Corn Steep Liquor (liqueur de trempage de maïs), (un sous produit), sans diminution significative de la production d'acide lactique.
- Parmi les sels minéraux additionnés au lactosérum ($MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ et KH_2PO_4), le KH_2PO_4 (**0,2g/l**) a donné des meilleurs résultats.
- La production d'acide lactique par la souche locale 15Vch(M) en batch et à pH non contrôlé sous les conditions optimales : **5 g/l** de CSL et **0,2 g/l** de KH_2PO_4 , présente une amélioration marquée où la concentration finale d'acide lactique atteint **8,5 g/l**.

Quant à la partie production d'EPS, nous pouvons dire que la souche épaississante *Streptococcus thermophilus* 1066 est capable de produire une quantité acceptable de ce produit textural en utilisant le lactosérum doux supplémenté avec l'extrait de levure.

L'étude que nous avons réalisée n'était pas très approfondie vu les contraintes temporelles et matérielles donc elle mérite d'être poursuivie et achevée en se basant sur les points suivants :

- ❖ Identification des souches non déterminées par les techniques de la biologie moléculaire et reconnaissance de leurs spécificités.
- ❖ Optimisation des paramètres physico-chimiques (T° et pH) pour un meilleur rendement.
- ❖ Déroulement de la fermentation à pH contrôlé en utilisant comme agents de neutralisation, hydroxyde de calcium, hydroxyde de sodium afin d'éviter l'inhibition par le pH.
- ❖ Fermentation en continu pour empêcher l'inhibition provoquée par l'accumulation de produit fini "Acide lactique".
- ❖ Utilisation des souches immobilisées car plusieurs recherches ont montré que les cellules immobilisées est plus performante qu'une cellule libre.

ANNEXES

Annexe 1

1-Matériels :

A) Equipement

- Autoclave.
- Etuves à incubation réglables à (30°C, 42°C).
- Bain marie.
- Four pasteur.
- Bec bunsen.
- plaque chauffante.
- Réfrigérateur à (4°C).
- Congélateur à (-22 °C).
- Balance analytique.
- Microscope photonique.
- pH -mètre.
- centrifugeuse.
- spectrophotomètre UV-Visible.

B) Verreries et autres :

- Jarre d'anaérobiose.
- Tubes à essais et flacon stériles.
- Pipettes pasteur stériles.
- Pipettes graduées en verre stériles.
- Fioles, Becher et Erlen Meyer stériles.
- Entonnoir.
- Thermomètre.
- Lames.
- Boîtes de pétrie.
- Portoirs de tube à essai : inox, bois.
- Les pinces.
- Spatules.
- Ecouvillons.
- Barreau magnétique.

C) Réactifs et solutions :

- TSE : « Tryptone sel eau »
- Ethanol
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 volumes.
- Disques d'oxydase.

- Violet de gentiane.
- Lugol.
- Fuchsine.
- Huile de vaseline.
- glycérol.
- Acide 3,5- dinitrosalicylique (DNS).
- Tartrate doublé.
- Solution de NaOH (1/9N, 1N, 5N).
- Solution de HCl (1N, 5N).
- Phénolphtaléine (1%).

➤ **Autres produits utilisés pour l'optimisation du milieu « lactosérum » :**

- Poudre du lait écrémé.
- Extrait de levure.
- Liqueur de trempage de maïs (corn steep liquor)
- Tween 80.
- Les oligoéléments :
 - **KH₂PO₄** : Potassium dihydrogène phosphate.
 - **FeSo₄** : Sulfate de fer.
 - **MgSo₄** : Sulfate de magnésium.
 - **MnSo₄** : Sulfate de manganèse.

D) Milieux de cultures :

Composition de milieu M17 (bouillon et agar)

Peptone de soja.....	5g/l
Peptone de viande.....	2,5g/l
Peptone de caséine.....	2,5g/l
Extrait de viande.....	5g/l
Extrait de levure.....	2,5 g/l
Lactose.....	5g/l
Acide ascorbique.....	0,5g/l
Glycérophosphate de sodium.....	19g/l
Sulfate de magnésium.....	0,25g/l
Eau distillée.....	950g/l

pH : 7,2

La composition du milieu M17 gélose: il s'agit du milieu précédant + 15 g/l d'agar.

Composition de milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) :

Protéose peptone n°3.....	10g/l
Extrait de viande	10g/l
Extrait de levure	5g/l
Glucose	20g/l
Tween 80	1g/l
Citrate d'ammonium.....	2g/l
Acétate de Na	5g/l
MgSO ₄	0,1g/l
MnSO ₄	0,05g/l
K ₂ HPO ₄	2g/l

Les milieux solides sont obtenus par addition de 15g/l d'agar-agar aux milieux liquides.

Le milieu de Chalmers :

-Composition :

Lactose	10 g/l
Peptone EVANS.....	03 g/l
Extrait de viande.....	03 g/l
Extrait de levure.....	03 g/l
Agar	15 g/l
Carbonate de calcium CaCO ₃	15 g/l
Solution aqueuse de rouge neutre à 1%.....	5 ml
Eau distillée qsp.....	1000 ml

- Préparation :

-Dissoudre les ingrédients : lactose, peptone, extrait de viande et de levure par ébullition.

-Faire refroidir et ajuster le pH à 6,8.

-Ajouter l'indicateur puis de carbonate de chaux finement pulvérisé.

-Biens agiter pour mettre en suspension homogène.

-Répartir en flacons (100 ml) ou tubes (15 ml).

-Autoclaver 20 min à 120°C, au moment de l'emploi faire fondre au bain-marie bouillant, bien agiter on remettre en suspension de CaCO₃, couler en boite de Petrie.

Annexe 2

Coloration de Gram :

L'épaisseur et la structure chimique de la paroi sont les facteurs pariétaux responsables de cette coloration. Il existe de nombreuses versions de la procédure à suivre, nous écrivons une ci-dessous.

1. Recouvrir le frottis fixé à la chaleur avec le violet de gentiane. Laisser agir deux (2) minutes. Jeter le colorant.
2. Recouvrir la préparation du lugol. Laisser agir 20 seconds. Jeter le mordant. Recommencer une deuxième fois (20 seconds).
3. Rincer la lame à l'eau.
4. Incliner la lame, laisser tomber goutte à goutte l'agent de décoloration (éthanol à 96°) jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore à l'extrémité de la lame.
5. Laver abondamment à l'eau distillée.
6. Recolorer à l'aide de la fuchsine. laisser agir une minute.
7. Rincer à l'eau distillée.
8. Sécher la lame au dessus de la flamme du bec bunsen ou sur la plaque chauffante. Observer au microscope.

Lecture:

Les germes colorés en violet sont dits Gram(+), ceux teintés en rose sont dits Gram(-).

Annexe 3

Dosage du lactose résiduel :

Le dosage est effectué selon la méthode de « **Bernfeld** » qui utilise la **spectrophotométrie** après une réaction colorimétrique.

Principe de dosage :

Les glucides réducteurs peuvent être dosés grâce à leurs propriétés réductrices. En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé dosable par colorimétrie à 530 nm. (**Figure 30**).

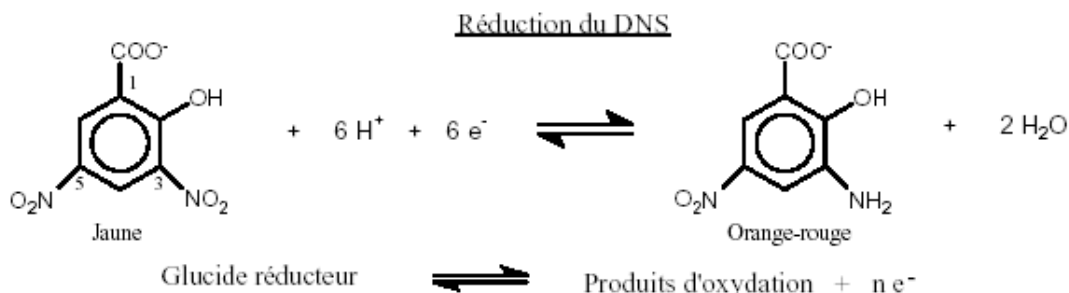


Figure 30: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.

La chimie de la réaction est complexe et la réaction d'oxydoréduction avec les glucides n'est pas stœchiométrique, donc dépendante des conditions opératoires. Les courbes d'étalonnage ne passent pas toujours par l'origine et les différents sucres donnent des colorations variables. Par conséquent on opérera par référence à une gamme d'étalonnage.

Préparation de la solution de DNS

2 g de DNS et 3,2 g de soude ont été dissous dans 70 ml d'eau distillée. Ensuite, 60 g de tartrate doublé de sodium-potassium ont été progressivement ajoutés à ce mélange sous chauffage et agitation. Le volume de ce mélange a été complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

Mode opératoire :

- Préparation de l'échantillon à doser :

Centrifuger 10ml de l'échantillon à 55 rpm pendant 20min, puis la filtré deux fois à l'aide d'un papier filtre ordinaire.

- Préparation de la solution colorée :

- 2 ml de filtrat obtenue
- 3 ml d'eau distillée filtrée
- 2 ml de solution de 3,5-DNS

- Boucher et homogénéiser les tubes, puis les porter au bain-marie à 100°C pendant 5 min exactement.

- Refroidir sous un courant d'eau froide (ou dans un bain d'eau froide).
- Ajouter 15 ml d'eau distillée filtrée.
- Mesurer les absorbances à 530 nm contre un blanc.

Expression des résultats :

La quantité de lactose résiduel a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les conditions expérimentales, et par conséquent le lactose consommé par les bactéries est calculé par une simple équation :

Lactose total de milieu – lactose résiduel = lactose consommé par les bactéries

Préparation de la gamme d'étalonnage de lactose:

- Préparer une solution mère étalon de lactose monohydraté à 2 g/l.
- Préparer une gamme d'étalonnage de 6 tubes contenant de 0 à 2 mg de lactose monohydraté par tube à partir de la solution étalon réalisée (voir le tableau suivant).

<u>N°</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
<u>Volume prélevé à partir de la solution mère (ml)</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>40</u>	<u>60</u>	<u>80</u>	<u>100</u>
<u>Volume total</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
<u>Volume de la solution à doser (ml)</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
<u>Volume de DNS</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
<u>Volume de l'eau distillée ajouté</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>15</u>
<u>Absorbance à 530nm.</u>	<u>0.066</u>	<u>0.131</u>	<u>0.247</u>	<u>0.392</u>	<u>0.550</u>	<u>0.724</u>

Les solutions sont plongées dans un bain marie à 100°C pendant 5 min puis dans un bain glacé.

Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 530nm.

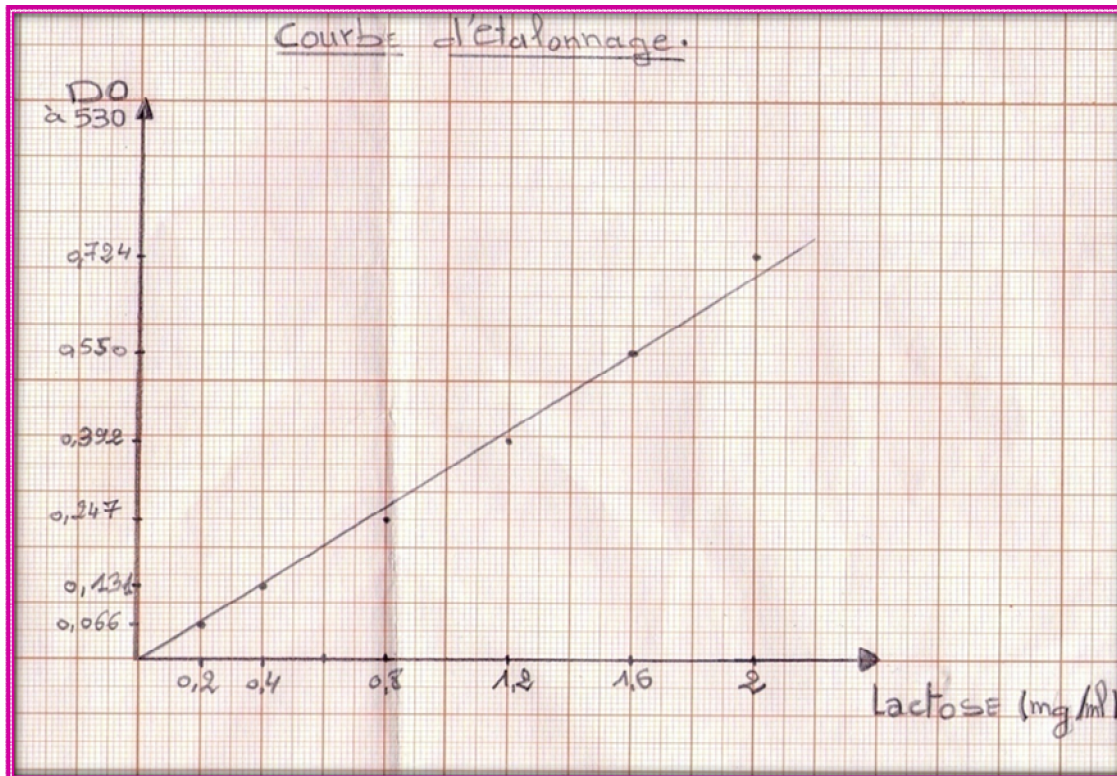


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de lactose.

Détermination du poids sec :

Une fois la fermentation terminée. La biomasse est évaluée en centrifugeant 10ml de la culture à 45 rpm pendant 15min. on récupère le culot qu'on lave deux fois avec l'eau distillée stérile et on centrifuge à chaque lavage.

En fin, on pèse le culot pour déterminer le poids en biomasse en matière fraîche puis on sèche dans un étuve à 100°C jusqu'à obtenu un poids constant, pour déterminer le poids en biomasse en matière sèche. Vor la photo ci-dessous.

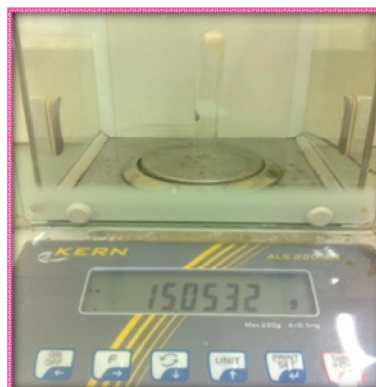


Figure 32: Détermination de la biomasse.

Tableau 17 : Prix des nutriments utilisés dans les expériences (Téllez-luis *et al.*, 2003) :

<u>Nutriments</u>	<u>Prix</u>
<u>CSL</u>	<u>36.06</u>
<u>EL</u>	<u>76.74</u>
<u>KH₂PO₄</u>	<u>30.29</u>
<u>MgSO₄</u>	<u>10.58</u>
<u>MnSO₄</u>	<u>15.03</u>
<u>FeSO₄</u>	<u>11.54</u>

Annexe 5

Tableau 18 : Résultat d'isolement et tests de sélection.

<u>Abréviations</u>	<u>Origine</u>	<u>Milieu</u>	<u>Incubation</u>	<u>Catalase</u>	<u>Chalmers</u>		<u>Oxydase</u>
					<u>teinte</u>	<u>Halo</u>	
<u>01 An</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>02 An</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>03 An</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>04 Br</u>	<u>Trayon droit de brebis</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	—+	=	=	<u>×</u>
<u>05 Br</u>	<u>Trayon droit de brebis</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	±	=	=	<u>×</u>
<u>06 Br</u>	<u>Trayon droit de</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3</u>	±	=	=	<u>×</u>

	<u>brebis</u>		<u>irs.</u>				
<u>07 Br</u>	<u>Trayon droit de brebis</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>08 Br</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>09 Br</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>+P</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>10 Br</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>11 Br</u>	<u>Gencive de l'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>—+ </u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>12 Vch</u>	<u>Gencive de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>13 Vch</u>	<u>Gencive de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>+P</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>14 Vch</u>	<u>Gencive de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>15 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>×</u>
<u>16 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>17 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>18 Vch</u>	<u>Trayon droit de</u>		<u>En +O₂ à 42°C pdt 3</u>	<u>+P</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

	<u>vache</u>	<u>M17</u>	<u>irs.</u>				
<u>19 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>20 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>21 Vch</u>	<u>Trayon droit de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>×</u>
<u>22 Gss</u>	<u>Gencive de génisse</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>23 Gss</u>	<u>Gencive de génisse</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>—+ </u>	<u>—</u>	<u>—</u>	<u>×</u>
<u>24 Gss</u>	<u>Gencive de génisse</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>25 Gss</u>	<u>Gencive de génisse</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>26 Gss</u>	<u>Gencive de génisse</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>27 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>28 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>29 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 irs.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

<u>30 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	=	±	±	=
<u>31 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	±	=	=	×
<u>32 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	±	=	=	×
<u>33 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
<u>34 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 3 jrs.</u>	±	=	=	×
<u>35 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	±	±	=
<u>36 Br</u>	<u>Trayon droit de brebis</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	=	=	×
<u>37 An</u>	<u>Gencive d'agneau</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	±	±	=
<u>38 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	±	±	=
<u>39 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	±	±	=
<u>40 Br</u>	<u>Gencive de brebis</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	=	=	=	×

			<u>irs.</u>				
<u>41 Br</u>	<u>Gencive de brebis</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>42 An</u>	<u>Gencive d'agneau</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	±	=	=	<u>×</u>
<u>43 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	±	±	=
<u>44 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>45 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>46 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	±	=	=	<u>×</u>
<u>47 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>48 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>49 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>50 Chv</u>	<u>Trayon droit de</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>×</u>

	<u>chèvre</u>		<u>irs.</u>				
<u>51 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>52 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>53 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>54 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>55 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	±	=	=	<u>×</u>
<u>56 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>57 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>×</u>
<u>58 Vch</u>	<u>Trayon gauche de vache</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>×</u>
<u>59 Br</u>	<u>Trayon droit de brebis</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	=	=	=	<u>×</u>
<u>60 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 irs.</u>	<u>+P</u>	±	=	±

<u>61 Chv</u>	<u>Trayon droit de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>62 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>63 Chv</u>	<u>Trayon gauche de chèvre</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 4 jrs.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>64 In p₁</u>	<u>Intestin de poulet p₁</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>65In p₁</u>	<u>Intestin de poulet p₁</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>66In p₁</u>	<u>Intestin de poulet p₁</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>67In p₁</u>	<u>Intestin de poulet p₁</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>68In p₁</u>	<u>Intestin de poulet p₁</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>69In p₂</u>	<u>Intestin de poulet p₂</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>70In p₂</u>	<u>Intestin de poulet p₂</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>71In p₂</u>	<u>Intestin de poulet p₂</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>

<u>72In p₂</u>	<u>Intestin de poulet p₂</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>73In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>74In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M 17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>±</u>
<u>75In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>×</u>
<u>76In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>±</u>
<u>77In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>78In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>79In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>80In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 42°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>±</u>
<u>81In p₁</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>82In p₁</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>83In p₁</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>

<u>84In p₁</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>85 In p₁</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>86In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>87In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>88In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>89In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>90In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>91In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>92In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>93In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>94In p₂</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>95In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>

<u>96In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>97In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>98In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>99In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>100In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>101In p₃</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>102In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>103In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>104In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>105In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>106In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>107In p₄</u>	<u>Intestin de poulet</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 42°C pdt 48 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>

<u>1*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>2*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>3*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>4*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>5*</u> Oli	<u>Olive</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>6*</u> Ch	<u>Chou</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	
<u>7*</u> Ch	<u>Chou</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>+P</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>8*</u> Ch	<u>Chou</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>9*</u> Ch	<u>Chou</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>10*</u> Chf	<u>Chou-fleur</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>
<u>11*</u> Chf	<u>Chou-fleur</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>12*</u> Chf	<u>Chou-fleur</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

<u>13*</u> Chf	<u>Chou-fleur</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>14*</u> Pmt	<u>Pomme de terre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>15*</u> Pmt	<u>Pomme de terre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>16*</u> Pmt	<u>Pomme de terre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>17*</u> Pmt	<u>Pomme de terre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>18*</u> Crt	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>19*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>MRS</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>20*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>=</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>=</u>
<u>21*</u> Bt	<u>Betterave</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>22*</u> Tm	<u>Tomate</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>23*</u> Tm	<u>Tomate</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>24*</u> Tm	<u>Tomate</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

<u>25* Crt</u>	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>26* Crt</u>	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>27* Crt</u>	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>28* Chf</u>	<u>Chou-fleur</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>29* Tm</u>	<u>Tomate</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>30* Tm</u>	<u>Tomate</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>31* Tm</u>	<u>Tomate</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>32* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>33* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>34* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>35* Crt</u>	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En +O₂ à 30°C pdt 24h.</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>P</u>
<u>36* Crt</u>	<u>Carotte</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

<u>37* Pmt</u>	<u>Pomme de terre</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>38* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>39* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>40* Bt</u>	<u>Betterave</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>41* Chf</u>	<u>Chou-fleur</u>	<u>M17</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>
<u>42* Ch</u>	<u>Chou</u>	<u>MRS</u>	<u>En -O₂ à 30°C pdt 24 h.</u>	<u>±</u>	<u>=</u>	<u>=</u>	<u>×</u>

+ : Réaction positive, - : **réaction négative**, +p : pseudocatalase, × : test non réalisé, -O₂ : en anaérobiose, +O₂ : en aérobose.

Tableau 19 : Critères de différenciation de *Lb.plantarum* (Luquet, 1986).

<u>Famille</u>	<u>Lactobacillaceae</u>
<u>Genre</u>	<u>Lactobacillus</u>
<u>Espèce</u>	<u><i>Lb.plantarum</i></u>
<u>Groupe sérologique</u>	<u>D</u>
<u>G+C %</u>	<u>44-46</u>
<u>Type fermentaire</u>	<u>Homolactique</u>
<u>Isomère de l'acide lactique</u>	<u>DL</u>
<u>Citratase (h)</u>	<u>±</u>
<u>Arginine dihydrolase (i)</u>	<u>=</u>
<u>Croissance à 10°C</u>	<u>±</u>

<u>Croissance à 15°C</u>	±
<u>Croissance à 40°C</u>	±
<u>Croissance à 45°C</u>	=
<u>Température optimale (°C)</u>	<u>30-35</u>
<u>Sucres fermentés (d) :</u>	
<u>C₅ ; -Arabinose</u>	<u>V</u>
<u>-Ribose</u>	±
<u>-Xylose</u>	<u>V</u>
<u>C₆ ; -Glucose</u>	±
<u>-Galactose</u>	±
<u>-Fructose</u>	±
<u>-Mannose</u>	±
<u>-Mannitol</u>	±
<u>-Sorbitol</u>	±
<u>C₁₂ ; -Lactose</u>	±
<u>-Maltose</u>	±
<u>-Saccharose</u>	±
<u>-Tréhalose</u>	±
<u>-Cellobiose</u>	±
<u>-Melibiose</u>	±
<u>C₁₃ ; -Salicine</u>	±
<u>C₁₅ ; -Esculine</u>	±
<u>C₁₈ ; -Raffinose</u>	±
<u>C₂₀ ; -Amygdaline</u>	±

(+) : Réaction positive pour moins 90% des souches.

(-) : Réaction négative pour moins 90% des souches.

(V) : Réaction variable, lente ou faible selon la souche.

(d) : production d'acide par fermentation des sucres.

(h) : production de CO₂ à partir des citrates en présence de sucre.

(i) : production de NH₃ à partir de l'arginine.

Annexe 6

Tableau 20 : Composition de l'extrait de levure (Ghaly *et al.*, 2003).

<u>Composition :</u>	<u>%</u>
----------------------	----------

Tableau 21: Composition de corn steep liquor.

composition poids %	Anon 1975	Zabriskie et al., 1982
Solides	40-50	50
Carbohydrates		05-08
Protéines	25-40	24
acides aminés		
Arginine		0,4
Cystine		0,5
Glycine		1,1
Histidine		0,3
Isoleucine		0,9
Leucine		0,1
Lysine		0,2
Methionine		0,5
Phenylalanine		0,3
Tryptophane		
Tryosine		0,1
Valine		0,5
Lipides	0	1
Fibres	0	1
Vitamines (mg/100ml)		
Inositol	602	

Choline	351	
Niacine (B6)	8,4	
Acide pantothenique	1,5	
Pyridoxine(B1)	0,9	0,2
Thiamine (B1)	0,3	0,09
Biotine	0,03	0,09
Minéraux (total ash)	8	8,8
K, P, Mg, Ca, S, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Mo, Se, Co.		

Annexe 7

Tableau 22 : Résultats de sélection des souches selon l'acidité et le pH.

-Après 24h d'incubation :

<u>La souche bactérienne</u>	<u>pH</u>	<u>Acidité (°D)</u>
<u>St 1066</u>	<u>5,27</u>	<u>55</u>
<u>7 Br (M)</u>	<u>5,99</u>	<u>30,5</u>
<u>15 Vch (M)</u>	<u>4,89</u>	<u>72</u>
<u>20 Vch (M)</u>	<u>5,91</u>	<u>27</u>
<u>30 Chv (M)</u>	<u>5,82</u>	<u>28</u>
<u>35 Vch (M)</u>	<u>5,75</u>	<u>30</u>
<u>37 An (G)</u>	<u>5,95</u>	<u>26,5</u>
<u>38 Chv (M)</u>	<u>5,87</u>	<u>27</u>
<u>39 Chv (M)</u>	<u>5,48</u>	<u>41,5</u>
<u>43 Chv (M)</u>	<u>5,87</u>	<u>27,5</u>
<u>73 Inp₃</u>	<u>6,34</u>	<u>22,5</u>
<u>77 Inp₃</u>	<u>6,34</u>	<u>21</u>
<u>78 Inp₄</u>	<u>6,30</u>	<u>21,5</u>
<u>1* Bt</u>	<u>6,31</u>	<u>21,5</u>
<u>7* Chf</u>	<u>5,74</u>	<u>43,5</u>

<u>10* Chf</u>	<u>5,13</u>	<u>53,5</u>
<u>20* Bt</u>	<u>5,15</u>	<u>45,5</u>

-Après 48 h d'incubation :

<u>La souche bactérienne</u>	<u>pH</u>	<u>Acidité</u>
<u>St 1066</u>	<u>4,45</u>	<u>60</u>
<u>7 Br (M)</u>	<u>5,30</u>	<u>57</u>
<u>15 Vch (M)</u>	<u>4,34</u>	<u>88,5</u>
<u>20 Vch (M)</u>	<u>5,36</u>	<u>47,5</u>
<u>30 Chv (M)</u>	<u>5,39</u>	<u>39,5</u>
<u>35 Vch (M)</u>	<u>4,90</u>	<u>58,5</u>
<u>37 An (G)</u>	<u>5,35</u>	<u>45</u>
<u>38 Chv (M)</u>	<u>5,55</u>	<u>35,5</u>
<u>39 Chv (M)</u>	<u>4,87</u>	<u>73</u>
<u>43 Chv (M)</u>	<u>5,60</u>	<u>35</u>
<u>73 Inp₃</u>	<u>5,70</u>	<u>48</u>
<u>77 Inp₃</u>	<u>6,04</u>	<u>37</u>
<u>78 Inp₄</u>	<u>5,26</u>	<u>41,5</u>
<u>1* Bt</u>	<u>5,63</u>	<u>40</u>
<u>7* Chf</u>	<u>5,45</u>	<u>64</u>
<u>10* Chf</u>	<u>5,48</u>	<u>66</u>
<u>20* Bt</u>	<u>4,80</u>	<u>70</u>



Résultats d'acidification du lactosérum enrichi par différentes concentrations de la poudre de lait écrémé et ensemencé par *Lb.plantarum*15Vch(M).

<u>ALg/l</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,25</u>	<u>2,35</u>	<u>2,55</u>	<u>2,85</u>	<u>3,20</u>	<u>3,45</u>	<u>3,65</u>	<u>5,25</u>
<u>2g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,30</u>	<u>2,45</u>	<u>2,60</u>	<u>2,70</u>	<u>2,85</u>	<u>3,20</u>	<u>3,45</u>	<u>6,00</u>
<u>4g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,35</u>	<u>2,50</u>	<u>2,55</u>	<u>2,80</u>	<u>3,00</u>	<u>3,20</u>	<u>3,50</u>	<u>5,90</u>
<u>6g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,30</u>	<u>2,35</u>	<u>2,65</u>	<u>2,70</u>	<u>2,90</u>	<u>3,15</u>	<u>3,65</u>	<u>5,85</u>
<u>8g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,45</u>	<u>2,55</u>	<u>2,65</u>	<u>2,85</u>	<u>3,00</u>	<u>3,30</u>	<u>3,90</u>	<u>7,20</u>

<u>pH</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,34</u>	<u>6,3</u>	<u>6,26</u>	<u>6,15</u>	<u>5,95</u>	<u>5,77</u>	<u>5,71</u>	<u>4,70</u>
<u>2g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,19</u>	<u>6,16</u>	<u>6,03</u>	<u>5,9</u>	<u>5,74</u>	<u>5,64</u>	<u>5,54</u>	<u>4,60</u>
<u>4g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,19</u>	<u>6,18</u>	<u>6,04</u>	<u>5,89</u>	<u>5,74</u>	<u>5,64</u>	<u>5,52</u>	<u>4,67</u>
<u>6g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,21</u>	<u>6,17</u>	<u>6,06</u>	<u>5,9</u>	<u>5,76</u>	<u>5,76</u>	<u>5,55</u>	<u>4,74</u>
<u>8g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,22</u>	<u>6,17</u>	<u>6,03</u>	<u>5,93</u>	<u>5,76</u>	<u>5,65</u>	<u>5,54</u>	<u>4,42</u>

■ Résultats d'acidification du lactosérum enrichi par différentes concentrations de l'extrait de levure et ensemencé par *Lb.plantarum*15Vch(M).

<u>ALg/l</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0,00g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,25</u>	<u>2,35</u>	<u>2,55</u>	<u>2,85</u>	<u>3,20</u>	<u>3,45</u>	<u>3,65</u>	<u>5,25</u>
<u>2,50g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,90</u>	<u>3,05</u>	<u>3,55</u>	<u>3,75</u>	<u>4,30</u>	<u>4,40</u>	<u>4,70</u>	<u>6,35</u>
<u>5,00g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,30</u>	<u>2,50</u>	<u>2,80</u>	<u>3,25</u>	<u>3,75</u>	<u>4,10</u>	<u>4,25</u>	<u>6,20</u>
<u>10,00g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,40</u>	<u>2,70</u>	<u>3,25</u>	<u>3,80</u>	<u>4,05</u>	<u>4,60</u>	<u>5,20</u>	<u>6,60</u>
<u>20,00g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,15</u>	<u>2,30</u>	<u>3,00</u>	<u>3,40</u>	<u>3,85</u>	<u>4,50</u>	<u>5,05</u>	<u>6,80</u>
<u>30,00g/l</u>	<u>1,90</u>	<u>2,40</u>	<u>2,35</u>	<u>3,40</u>	<u>3,90</u>	<u>3,95</u>	<u>4,50</u>	<u>5,20</u>	<u>7,60</u>

<u>pH</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,29</u>	<u>6,26</u>	<u>6,15</u>	<u>5,96</u>	<u>5,71</u>	<u>5,57</u>	<u>5,45</u>	<u>4,73</u>

<u>2,5g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,20</u>	<u>5,97</u>	<u>5,77</u>	<u>5,51</u>	<u>5,30</u>	<u>5,15</u>	<u>5,08</u>	<u>4,57</u>
<u>5g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,30</u>	<u>6,23</u>	<u>5,84</u>	<u>5,69</u>	<u>5,45</u>	<u>5,29</u>	<u>5,18</u>	<u>4,60</u>
<u>10g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,30</u>	<u>6,26</u>	<u>5,85</u>	<u>5,72</u>	<u>5,46</u>	<u>5,28</u>	<u>5,16</u>	<u>4,62</u>
<u>20g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,32</u>	<u>6,29</u>	<u>5,85</u>	<u>5,71</u>	<u>5,55</u>	<u>5,39</u>	<u>5,27</u>	<u>4,67</u>
<u>30g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,31</u>	<u>6,34</u>	<u>5,93</u>	<u>5,69</u>	<u>5,66</u>	<u>5,52</u>	<u>5,42</u>	<u>4,72</u>

■ Résultats d'acidification du lactosérum enrichi par différentes concentrations de Corn steep liquor et ensemencé par *Lb.plantarum*15Vch(M).

<u>ALg/l</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,25</u>	<u>2,35</u>	<u>2,55</u>	<u>2,85</u>	<u>3,2</u>	<u>3,45</u>	<u>3,65</u>	<u>5,25</u>
<u>2,5g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,65</u>	<u>2,8</u>	<u>3,0</u>	<u>3,6</u>	<u>3,85</u>	<u>4,0</u>	<u>4,2</u>	<u>6,40</u>
<u>5g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,2</u>	<u>2,35</u>	<u>2,7</u>	<u>3,1</u>	<u>3,4</u>	<u>3,7</u>	<u>4,2</u>	<u>6,45</u>
<u>10g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,15</u>	<u>2,45</u>	<u>2,85</u>	<u>3,0</u>	<u>3,4</u>	<u>3,7</u>	<u>4,3</u>	<u>6,25</u>
<u>20g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,0</u>	<u>2,2</u>	<u>2,5</u>	<u>3,0</u>	<u>3,2</u>	<u>3,55</u>	<u>4,1</u>	<u>6,00</u>
<u>40g/l</u>	<u>1,9</u>	<u>2,25</u>	<u>2,4</u>	<u>3,9</u>	<u>3,0</u>	<u>3,55</u>	<u>3,65</u>	<u>3,8</u>	<u>5,90</u>

<u>pH</u>	<u>T₀</u>	<u>T₁</u>	<u>T₂</u>	<u>T₃</u>	<u>T₄</u>	<u>T₅</u>	<u>T₆</u>	<u>T₇</u>	<u>_____ 24h</u>
<u>0g/l</u>	<u>6,37</u>	<u>6,29</u>	<u>6,26</u>	<u>6,15</u>	<u>5,96</u>	<u>5,71</u>	<u>5,57</u>	<u>5,45</u>	<u>4,73</u>
<u>2,5g/l</u>	<u>6,31</u>	<u>6,23</u>	<u>6,06</u>	<u>5,78</u>	<u>5,60</u>	<u>5,38</u>	<u>5,25</u>	<u>5,16</u>	<u>4,53</u>
<u>5g/l</u>	<u>6,31</u>	<u>6,26</u>	<u>6,06</u>	<u>5,74</u>	<u>5,56</u>	<u>5,36</u>	<u>5,20</u>	<u>5,06</u>	<u>4,39</u>
<u>10g/l</u>	<u>6,31</u>	<u>6,24</u>	<u>6,06</u>	<u>5,81</u>	<u>5,61</u>	<u>5,37</u>	<u>5,20</u>	<u>5,05</u>	<u>4,45</u>
<u>20g/l</u>	<u>6,31</u>	<u>6,22</u>	<u>6,09</u>	<u>5,89</u>	<u>5,74</u>	<u>5,54</u>	<u>5,39</u>	<u>5,19</u>	<u>4,47</u>
<u>40g/l</u>	<u>6,31</u>	<u>6,22</u>	<u>6,14</u>	<u>5,98</u>	<u>5,84</u>	<u>5,75</u>	<u>5,62</u>	<u>5,45</u>	<u>4,60</u>

■ Résultats d'acidification du lactosérum enrichi par différentes concentrations de Tween 80, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄ et KH₂PO₄ ensemencé par *Lb.plantarum*15Vch(M).

<u>Tween 80</u>	<u>AL g/l</u>	<u>Ph</u>
-----------------	---------------	-----------

<u>0,5 ml/l</u>	<u>5,65</u>	<u>4,72</u>
<u>1 ml/l</u>	<u>5,6</u>	<u>4,74</u>
<u>1,5 ml/l</u>	<u>5,6</u>	<u>4,74</u>
<u>2 ml/l</u>	<u>5,2</u>	<u>4,75</u>

<u>MgSO₄</u>	<u>AL g/l</u>	<u>Ph</u>
<u>0,1g/L</u>	<u>5,55</u>	<u>4,74</u>
<u>0,2 g/L</u>	<u>5,65</u>	<u>4,76</u>
<u>0,4 g/L</u>	<u>5,75</u>	<u>4,72</u>
<u>0,6 g/L</u>	<u>7,05</u>	<u>4,32</u>
<u>0,7g/l</u>	<u>5,9</u>	<u>4,67</u>

<u>MnSO₄</u>	<u>AL g/l</u>	<u>pH</u>
<u>0,025g/l</u>	<u>5,2</u>	<u>4,59</u>
<u>0,05g/l</u>	<u>5,55</u>	<u>4,43</u>
<u>0,1g/l</u>	<u>5,5</u>	<u>4,44</u>
<u>0,15g/l</u>	<u>5,16</u>	<u>4,59</u>

<u>FeSO₄</u>	<u>AL g/l</u>	<u>pH</u>
<u>0,01g/l</u>	<u>7,7</u>	<u>4,04</u>
<u>0,02g/l</u>	<u>6,1</u>	<u>4,60</u>
<u>0,03g/l</u>	<u>5,95</u>	<u>4,59</u>
<u>0,04g/l</u>	<u>5,9</u>	<u>4,58</u>

<u>0,05g/l</u>	<u>5,85</u>	<u>4,56</u>
-----------------------	--------------------	--------------------

<u>KH₂PO₄</u>	<u>AL g/l</u>	<u>pH</u>
<u>0,1g/l</u>	<u>7,4</u>	<u>4,07</u>
<u>0,2g/l</u>	<u>7,9</u>	<u>4,03</u>
<u>0,3g/l</u>	<u>7,3</u>	<u>4,10</u>
<u>0,4g/l</u>	<u>7,1</u>	<u>4,22</u>
<u>0,5g/l</u>	<u>6,85</u>	<u>4,49</u>
<u>0,6g/l</u>	<u>7,3</u>	<u>4,39</u>

■ Résultats d'acidification des milieux testés **M1**, **M2**, **M3** et **M4** ensemencés par *Lb.plantarum*15Vch(M).

M1	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	24h
pH	6,31	6,24	6,01	5,77	5,49	5,3	5,12	5,05	4,52
AL g/l	1,9	2,8	3,1	3,35	3,85	4,25	4,3	4,45	6,3

M2	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	24h
pH	6,31	6,25	6,07	5,8	5,49	5,41	5,22	5,14	4,56
AL g/l	1,9	2,75	2,9	3,25	3,45	3,7	3,8	3,9	5,55

M3	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	24h
pH	6,31	6,23	6,03	5,76	5,48	5,26	5,08	5,08	4,49
AL g/l	1,9	2,7	3,15	3,45	3,8	4,3	4,5	4,55	6,05

M4	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	24h
pH	6,37	6,26	6,21	6,04	5,9	5,7	5,6	5,51	4,3
AL g/l	1,9	2,65	2,95	3,15	3,25	3,65	3,75	4	8,5

Annexe 8

Résultats trouvées pour la production des exopolysaccharides par la souches locale *sterptococcus thermophilus* 1066 sur différents milieux

<u>Composition du milieu</u>	<u>Elliker</u>	<u>Lait</u>	<u>E. de levure 0.5g/l</u>	<u>E. de levure 1g/l</u>	<u>E. de levure 1,5g/l</u>	<u>gluc 25g/l</u>
<u>Quantité d'EPS (g/l)</u>	<u>5,35</u>	<u>5,22</u>	<u>6,153</u>	<u>6,72</u>	<u>6,85</u>	<u>8,864</u>

Variation du pH et viscosité de la souche locale *sterptococcus thermophilus* 1066 à base de lactosérum supplémenté.

Composition du milieu	lait écrémé	lactosérum(LS)	LS+1% E.de levure	LS+1,5% E.de levure	LS+2,5% E.de levure
pH	5,7	5,32	4,74	4,55	4,56
Viscosité (pa.s)	6	7,5	8	9	8,45

<u>Composition du milieu</u>	<u>lait écrémé</u>	<u>lactosérum(LS)</u>	<u>LS+1% E.de levure</u>	<u>LS+1,5% E.de levure</u>	<u>LS+2,5% E.de levure</u>
<u>Quantité d'EPS(g/l)</u>	<u>5,3</u>	<u>5</u>	<u>6,45</u>	<u>10</u>	<u>9,4</u>

<u>Milieu utilisé</u>	<u>Elliker</u>	<u>Lait</u>	<u>E. de levure 0.5g/l</u>	<u>E. de levure 1g/l</u>	<u>E. de levure 1,5g/l</u>	<u>E. de levure 2,5g/l</u>	<u>gluc 25g/l</u>
<u>pH</u>	<u>5,8</u>	<u>4,7</u>	<u>4,75</u>	<u>4,65</u>	<u>4,56</u>	<u>4,5</u>	<u>4,45</u>
<u>Viscosité(pa.s)</u>	<u>0</u>	<u>5,2</u>	<u>6,3</u>	<u>6,56</u>	<u>6,7</u>	<u>6,2</u>	<u>9,42</u>

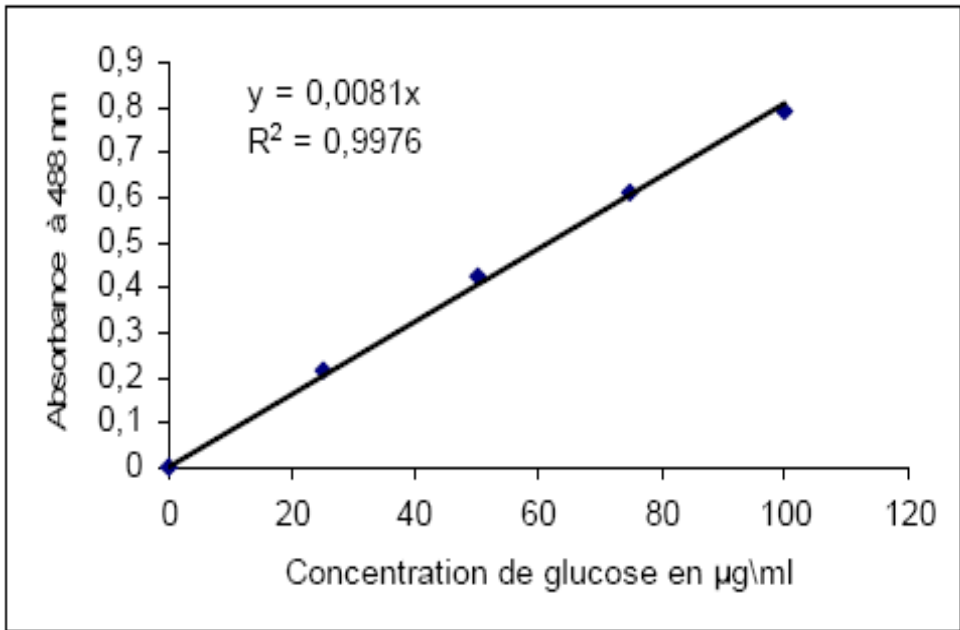


Figure 37 : Courbe d'étalonnage de glucose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Simon P. et Meunier R.** 1970. Microbiologie industrielle et génie biochimique. Ed. Masson et Cie. (Paris). 350p.
2. **Novel G.** 1993. Les bactéries lactiques *In* : microbiologie industrielle ; les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et Documentation, Lavoisier. (Paris). p.169-373.
3. **Pilet M.F., Magras C. et Federidhi M.** 2005. Bactéries lactiques. *In*: Bactériologie alimentaire; compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} Ed. Technique et documentation Economica. (Paris). P.219-242.
4. **Vickroy TB.** 1985. Lactic acid. *In*: Blanch HW, Drew S, Wang DIC, editors. The Practice of Biotechnology: Commodity Products. Elmsford, NY:Pergamon Press. p. 761–76.
5. **Cheng P., Muller RE., Jaeger S., Bajpai R. et Iannotti EL.** 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J Ind Microbiol.*7: 27–34.
6. **Leveau J.Y et Bouix M.** 1993. Microbiologie industrielle ; les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed Technique et Documentation, Lavoisier, 612p.
7. **Orla-Jensen S.** 1919. The Lactic acid bacteria. *Mem. Acad. Roy. Sci. Copenhagen. Sect. Sci.* 5: 81-196.
8. **De Roissart H. B.** 1986. Bactéries lactiques. *In* : Laits et produits laitiers vache, brebis et chèvre, Tome 3. Ed .Technique et Documentation Lavoisier (Paris). p.343-414.
9. **Ström, K., Schnurer J. et Melin P.** 2005. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters.* 246:119-124.
10. **Axelsson L.** 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *In*: Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects., Eds Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., New York: Marcel Dekker., pp1-66.
11. **Bourgeois C.M et Larpent J.P.** 1996. Microbiologie alimentaire ; aliments fermentés et fermentation alimentaires. Tome 2. 2^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier (Paris) 523p.
12. **De Roissart H et Luquet F. M.** 1994. Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologies, Vol 1. Ed. Uriage : Lorica. Lavoisier (Paris).p.605.
13. **Dortu C. et Thonart P.** 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* .13, 143-154.

14. **Stiles M. E et Holzapfel W. H.** 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.* 36: 1-29.
15. **Larpent J.P.** 1996. *In microbiologie alimentaire; aliments fermentés et fermentation alimentaires.* Tome 2. 2^{ém} Ed, Technique et Documentation. Lavoisier (Paris). p.4-33.
16. **Pilet M .F.** Magras C. et Federighi M. 1998. Bactéries lactiques. *In : Manuel de bactériologie alimentaire.* polytechnica. (Paris). p235-260.
17. **Federighi M.** 2005. Bactériologie alimentaire; compendium d'hygiène des aliments. 2^{ém} Ed. technique et documentation. Economica. (Paris). 292p.
18. **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M. C. et Janssens.** 1994 caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques.* Vol. 1 .Ed. Uriage : Loriga. Lavoisier (Paris). p. 25-116.
19. **Kandler O. et Weiss N.** 1986a. Genus lactobacillus. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1209-1234.
20. **Bottazzi V.** 1988. An introduction to red shaped lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 303-315.
21. **Fujisawa T., Benno Y., Yaeshima T. et Mitsuoka T.** 1992. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus* group A3 (Johnson et al., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakawa, 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:487-491.
22. **Suhigara T. F.** 1985. The lactobacilli and streptococci bakery products. *In: Bacterial starter cultures for foods.* Coord. Gilliland S.E. Ed. CRC. Press, Boca Raton (Florida). p. 120-125.
23. **Hammes W. P., Weiss N. et Holzapfel W.** 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *In: The prokaryotes, Vol2.* Coord. Balows H. Truper M., Dworkin W., Harder et Schleifer K. H. Ed. Springer-Verlag, (New York). p. 1535-1594.
24. **Schleifer K.H. et Kilpper-Bälz R.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *steptococci*, *enterococci* and *lactococci*. *System. Appl. Microbiol.*, 10 : 1-19.

- 25. Sutra L., Federighi M. et Jouve J-L.** 1998. Manuel de bactériologie alimentaire, polytechnica. (Paris). 260p.
- 26. Garvie E.I.** 1984. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. *In: Advance in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and fermented Milk*, F.L. Davies, B.A. Law éd., Ch.2, Elsevier Applied Science Publ., London. p. 35-66.
- 27. Hardie J.M.** 1986a. Other streptococci. *In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol. 2. Eds. P.H.A. Sneath *et al*; Williams, Wilkins, Baltimore. P.1068-1071.
- 28. Hardie J. M.** 1986. Oral streptococci. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mai rand M. E. Sharpe (Ed) Williams, Wilkins, Baltimore. p. 1054-1063.
- 29. Jones D.** 1978. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. *In Streptococci*, F. A. Skinner, L. B. Quesnel. Ed. Academic Press, London. p.1-49.
- 30. Garvie E. I.** 1986b. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68^{AL}. *In : Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams, Wilkins, Baltimore : 1075-1079.
- 31. Garvie E. I.** 1986a. Genus *Leuconostoc* Van Tieghem 1978. *In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. vol. 2. Eds. P.H.A. Sneath *et al*; Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1071-1075.
- 32. Dellaglio F. et Torriani S.** 1986. DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *J. Appl. Bacteriol.* 60: 83-92.
- 33. Baccus J. N. et Brown W. L.** 1985. The Lactobacilli: meat products. *In: Bacterial starter culture for foods*. Coord Gilliland S.E. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. p. 58-72.
- 34. Devoyod J.J., Poullain F.** 1988. Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Le lait*, 68 : 249-280.
- 35. Dicks L. M. T., Dellaglio F. et Collins M. D.** 1995. Proposed to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bactriol.* 45: 395-397.

- 36. Scardovi V.** 1986. Genus bifidobacterium Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. *In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology* . Vol. 2. Williams et Wilkins, Baltimore. P.1418-1434.
- 37. Mitsuoka T.** 1989. *Bifidobacterium* microecology. *In: les laits fermentés*. syndifrais, éd., John Libbey Eurotext, (Paris). p.41-48.
- 38. Desmazeaud M.J et De Roissart H.** 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques*, Vol. 1 Ed. Uriage : Lorica. Lavoisier (Paris). p. 169-207.
- 39. Marshall V.M.E. et Law B.A.** 1984. The physiology and growth of dairy lactic lactic-acid bacteria. *In: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, F.L Davies et B.A. Law Ed. Elsevier Applied Science Publishers. (London). p.3:67-98.
- 40. Condon S.** 1983. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Ir . J . Food Sci. Technolol.*, 7:15-25.
- 41. Condon S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbial. Rev.* 46:269-280.
- 42. Reiter B. et Moller-Madsen A.** 1963. Cheese and butter starters. *J. Dairy Res.* 30, 419-456.
- 43. Mundt J. O.** 1986. *Lactic and Streptococci*. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.2. Eds. P.H.A. Sneath *et al* ; Williams et Wilkins, Baltimore. p. 1063-1065.
- 44. Kandler O. et Weiss N.** 1986b. Regular, non-sporforming Gram-positive rods. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore. p.1208-1209.
- 45. Luquet F.M.** 1986. Lait produits laitiers ; vache-brebis-chèvre. Tome3 ; qualité, énergie et tables de composition. Ed. Technique et Documentation Lavoisier (Paris).445p.
- 46. Cerning J. Bouillanne C., Landon M. et Desmazeaud M. J.** 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sci. Aliments*. 10: 443-451.
- 47. Kobayashi M. et Matsuda K.** 1974. The dextransucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochem. Biophys. Acta.* 370: 441-449.
- 48. Otts D.R et Day D.F.** 1988. Dextransucrase secretion in *Leuconostoc mesenteroides*

depends on the presence of a transmembrane proton gradient. *J. Bacteriol.* 170 : 5006-5011.

49. Dols M., Chraïbi W., Remand S., Blindly N. D. 1997. Growth and energetic of *Leuconostoc mesenteroides* NRPL β -1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(6): 2159-2165.

50. Mills O.E., Thomas T.D. 1981. Nitrogen source for growth of lactic streptococci in milk. *New Zealand. Dairy Sci. Technol.* 16:43-55.

51. Montel M. C. et Champomier M. C. 1987. Arginine metabolism in *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2683-2685.

52. Divies C., Frey L., Hubert J.C et De Roissart H. 1994, métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. *In: bactéries lactiques. Vol. I. Ed. Uriage: Loriccia. Lavoisier. (Paris). P.291-307.*

53. Badis A. 2004. Identification et caractérisation technologique de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de quatre populations caprines locales. Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire. Université d'Oron. 145p.

54. Kalman S.M. et Duffield P.H. 1964. Purification and properties of carbamate Kinase from *streptococcus faecalis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 92 : 498-515.

[55. Ferro K.J., Bender G.R., Marquis R.E. 1983. Coordinately repressible arginine deiminase system in *streptococcus sanguis*. *Curr. Microbiol.* 9 : 145.

56. Nour M.A., Shalaby S.O., ABD El-Tawab G. et Mohamed O.A. 1986. Physiological properties of *streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy product. *Egyptian J. Dairy Sci.* 14 : 135-141.

57. Heap H.A. et Rhichardson G.H. 1985. The proteolytic effect of fast-coagulating strains of *streptococcus cremoris* New Zealand. *J. Dairy Sci. Technol.* 20: 155-161.

58. Pearce L.E., Skipper N.A. et Jarvis B.D.W. 1974. Proteinase activity in slow lactic acid producing variants of *Streptococcus cremoris*. *App. microbiol.* 27 : 933-937.

59. Reiter B. et Oram J. D. 1962. Nutritional studies on cheese starters. I. Vitamin and amino acid requirements of single strain starters. *J. Dairy Res.* 29 : 63-77.

60. Guss M. L. et Delwiche E. A. 1954. *Streptococcus thermophilus*. I. *Bacteriol.* 67 : 714-717.

- 61. Ramasamy V. et Natarajan A.M.** 1981. Purine and pyrimidine requirements of active lactic and bacteria. *Dairy Sei. Abstr.* 43, 243.
- 62. Selby-Smith J., Hillier A. J., Lees G. J. et Jago G. R.** 1975. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.* 42, 123-138.
- 63. Zielke H., Kneifel H., Webb L.L. E. et Sseder C. J.** 1978. Stimulation of Lactobacilli by aqueous extract of the green alga *Scenedesmus acutus* 276-3a. *Eur. J. Appl. Microb. Biotec.* 6, 79-86.
- 64. Ledesma O.V. et De Ruiz Holgado A.** 1977. A synthetic medium for comparative studies of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 42:272-276.
- 65. Law B. A.** 1982. Cheeses. *In: Fermented Foods.* Vol. 7. Ed. Rose (A. H.). London. Academic Press.
- 66. De Man J. C., Rogosa M. et Sharpe M. E.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bacteriol.* 23 : 130-135.
- 67. M. J.** 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait.* 63 :267-316.
- 68. Kolodkin A. M.** 1979. Resistance to copper of lactic acid bacteria used in cheese starters. *Dairy Sc. Abstr.* 41, 17
- 69. Poullain F.** 1994. Evolution de préparations commerciales de ferments lactiques. *In: bactéries lactiques.* Vol. I. Ed. Uriage: Lorica. Lavoisier. (Paris). P. 495-498.
- 70. Auclair C et Accolas J. P.** 1983. Thermophilic lactic starters. *J. Foods. Sci.* 7: 27-38.
- 71. Bottazzi V. et Mercenier A.** 1994. Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. *In: bactéries lactiques.* Vol. 2. Ed. Uriage. Lorica. Lavoisier. (Paris). P.409-418.
- 72. Audic J.L., Chaufer B. et Daufin G.** 2003. Non-food applications of milk components and dairy co-products : A review. INRA, EDP Sciences. p. 417-438.
- 73. Alais C.** 1981. La valorisation du lactosérum " les bases et les problèmes". *Technique laitière.* N° 952. p. 7-10.

- 74. Luquet F. M.** 1990. Lait et produits laitiers ; vache- brebis-chèvre. Tome2 : Les produits laitiers, *Transformation et technologies* ; 2^{ème} .Ed. Technique et documentation-Lavoisier. (Paris). 290p.
- 75. Kosikowski F.V.** 1979. Utilisation de lactosérum et produit à base de lactosérum, Paris, revue laitière française n° 372.
- 76. Mereo J.** 1980. Les utilisations industrielles de sérum, fromagerie. Paris, revue française n° 365. 401p.
- 77. Gonzfilez Siso M. I.** 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57. 1: 1-11.
- 78. Marwaha S.S et Kenned J.F.** 1988. Review: Whey-pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science and Technology*. 23: 323 - 336.
- 79. Sottiez P.** 1990. Produits dérivés des fabrications fromagères *In* : Lait et produits laitiers ; vache- brebis-chèvre ; Tome2 : Les produits laitiers, *Transformation et technologies* ; 2^{ème} .Ed. Technique et documentation-Lavoisier. (Paris). p. 357-392
- 80. Mahaut M., Jeantet R., Schuck P. et Brulé G.** 2000. Les produits industriels laitiers. Ed .Technique & documentation. Landres-Paris-New york. 178p.
- 81. Boudier J.F et Luquet F.M.** 1980. Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Actualités scientifiques et techniques en industries agroalimentaires*. 136p.
- 82. Vignola C.L.** 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait ; écol Polytechnique de Montréal. 422p
- 83. Luquet F. M.** 1985. Lait et produits laitiers ; vache- brebis-chèvre. Les produits laitiers, *Transformation et technologies*. Ed. Technique et documentation-Lavoisier. (Paris) .637p.
- 84. Veissyere R.** 1975. Technologie du lait. Edition Masson Rustique. Paris. 349p.
- 85. Fevrier C. et Collet J.** 1975. Considérations sur l utilisation du lactosérum en industrie alimentaire. *Revue Laitière Français* N°332.
- 86. Luquet F.M. et Boudier J.F.** 1984. Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria.*, 21, p. 1-7, 66, 83-90.

- 87. FAO.** 1995. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : alimentation et nutrition n°28. organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture Rome. 270p.
- 88. Berry D.** 2000. Ingredients foods. *Dairy foods*. 101(4), p : 32.
- 89. Botofonja gina K.** 1994. Etude de l'activité acidifiante de *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* et *Lactobacillus delbruckii ssp bulgaricus* et croissance d'un ferment lactique sur lactosérum. Mémoire d'ingénieur en technologie des industries agroalimentaires. INA, El-Harrach. Alger, 90p.
- 90. Omar S et Sabry S.** 1991. Microbial biomass and protein production from whey. *Journal of islamic academy of sciences*, 4 :170-172.
- 91. Poget-Ramsier C.** 1993. Production d'acide lactique et acétique en vue d'une valorisation industrielle du petit lait et de son permeat par fermentation. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de Lausanne.
- 92. Bergmair D.** 2002. Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595Md'un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments, université Laval.
- 93. Thompson J. et Gentry-Weeks C. R.** 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologiques. Vol. 1. Ed. Uriage : Loriga. Lavoisier (Paris). p. 239-290.
- 94. Hui Y.H. et George G Khachatourians.** 1995. Food biotechnology : microorganisms. food science and technology (Canada) 745 p.
- 95. Hofvendahl K et Haln-Hagerdal B.** 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and microbial technology*. 26 :87-107.
- 96. Jarry A.** 1994. Production industrielle d'acide lactique. *In* : Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologiques. Vol. 2. Ed. Uriage : Loriga. Lavoisier (Paris). p. 519-525.
- 97. Gurr M.I.** 1987. Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, pp. 337-342.

- 98. Jehanno D., Thuault D. et Bourgeois C.M.** 1992. Development of a method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L(+)-isomer of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, pp. 4064–4067.
- 99. Adams M.R.** 1998. Fermented weaning foods. *In: Woods, B.J.B., Editor. Microbiology of Fermented Foods. Vol. 2.* Blackie Academic & Professional, London. pp. 791–811.
- 100. Hurok Oh., Young-Jung Wee., Jong-Sun Yun., Seung Ho Han., Sangwon Jung., Hwa-Won Ryu.** 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology.* 96 :1492–1498.
- 101. Djidel A.** 2007. production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues semi-continues et continues. Thèse de doctorat en biotechnologies et industries alimentaires Institut national polytechnique de Lorraine. 217p.
- 102. Ryu, H.W., Yun, J.S. et Wee, Y.J.** 2003. Lactic acid. *In: Pandey, A. Ed. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology.* The Haworth Press, New York. 635p.
- 103. Lunt, J.** 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polym. Degrad. Stabil.* 59 : 145–152.
- 104. Yun J.S. et Ryu, H.W.** 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Proc. Biochem.* 37 : 235–240.
- 105. Datta R., Tsai S.P., Bonsignor P., Moon S. et Frank J.** 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev.* 16, pp. 221–231.
- 106. Sutherland I.W.** 1972. Bacterial exopolysaccharides dans A.H. Rose, ed. *Advances in Microbial Physiology.* Academic Press, New York, NY, USA.
- 107. Cerning J. (1990)** Exocellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Microbiol Rev* 87: 113-130.
- 108. Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995)** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 124: 1401-1412.
- 109. Low D., Ahlgren J.A., Horne D., McMahon D.J., Oberg C.J. & Broadbent J.R.** Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6) 2147-2151.

- 110. Majorella H.W., Blanch C.R. et Wilke.** 1983. By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevicea*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 25, p. 103-121.
- 111. Cerning J. (1994)** Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques.
- 112. Bourgeois C.M et Leveau J.Y.** 1980. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Le contrôle microbiologique. Vol 3. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier (Paris) 198p.
- 113. Leclerc H., Izard D., Husson M-O., Wattre P. et Jakubczak E.** 1983. Microbiologie générale. Ed. doin éditeurs-paris. 310p.
- 114. Chamba J.F., Duong G., Fazel A. et Prost F.** 1994. Sélection des souches de bactéries lactiques *In* : Bactéries lactiques ; aspects fondamentaux et technologies. Vol. 1. Ed. Uriage : Lorica. Lavoisier (Paris).P.499-520.
- 115. Albenzino M., Corbo M. R., Rehman S. U., Fox P. F., De Angelis M., Corsetti A., Sevi A. et Gobetti M.** 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food. Microbiol.* 67: 35-48.
- 116. Sharpe M. E.** 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *J. Soc. Dairy Technol.* 32: 9-18.
- 117. Boudier J.F. et Luquet F.M.** 1981. Dictionnaire laitier. 2^{ème} Ed. Tec. & Doc. (Paris). 220 p.
- 118. Luquet F. M et Corrieu G.** 2005. Bactéries lactiques et pro biotiques .Ed Lavoisier (Paris). 307 p.
- 119. Yang S. T. et Silva M.** 1995. Novel products and new technology for use a familiar carbohydrate milk lactose. *Journal of dairy science.* 78 : 2541-2562.
- 120. El Soda M., Said H., Desmazeaud M.J.** 1985. Proteolytic activity of two U.V. mutants from *Lactobacillus plantarum*. *Egyptian J. Dairy Sci.*13 :185-195.
- 121. Nancib N., Nacib A., Boudjelal A., Benslimane C., Blanchard F. et Boudrant J.** 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresour. Technol.* 78, pp. 149–153.

- 122. Rivas B., Moldes A.B., Domínguez J.M. et Parajó. J.C.** 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*, *Int J Food Microbiol.* 97, pp. 93–98.
- 123. Abidi N.** 2009. Valorisation du lactose et du lactosérum en acide succinique par fermentation bactérienne. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès Sciences (M. Se.) l'Université Laval. 70p.
- 124. Levander F. et Radström P.** 2001. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharid biosynthesis on glucose and lactose using *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ. Microbiol.* N° 6. p.2734-2738.
- 125. Amrane A.** 2000. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, N° 75. p.223-228.
- 126. Cardinal E.V. et Hedrick L.R.** 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content, *J. Biol. Chem.* 172 : 609–612.
- 127. Kadam K.L. et Newman M.N.** 1997. Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 625–629.
- 128. Silveira M.N., Wisbeck E., Hoch, I. et Jonas R.** 2001. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zimomonas mobilis* ATCC29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 442–445.
- 129. Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N. et Chang Y.K.** 2000. Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 5: 379–381.
- 130. Cheilas T., Stoupis T., Christakopoulos P., Katapodis P., Mamma D., Hatzinikolaou D.G., Kekos D. et Macris B.J.** 2000. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase, *Proc Biochem.* 35: 557–561.
- 131. Téllez-Luis S.J., Moldes A.B., Alonso J.L. et Vázquez M.** 2003. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. *J. Food Sci.* 68, 1454–1458.
- 132. Lei Yu., Ting Lei., Xiaodong Ren., Xiaolin Pei. et Yan Feng.** 2008. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochemical. Engineering Journal.* 39 : 496-502.

- 133. Bustos G., Moldes A.B., Alonso J.L., Vázquez M.** 2004. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*. 21: 143-148.
- 134. Hujanen M., Linko S., Linko Y.Y. et Leisola M.** 2001. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+) (*S*)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-411. *Appl. Microbiol. Biot.* 56. pp. 126–130.
- 135. Naveena B.J., Altaf M., Bhadriah K. et Reddy G.** 2005. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technology*. 96:485-490.
- 136. Chauhan K., Trivedi U. et Patel K.C.** 2005. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technology*.
- 137. Givry S.** 2006. Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bif fermentans*. Thèse de doctorat. UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, Laboratoire de Microbiologie Industrielle, UMR FARE 614, INRA, 9-14.
- 138. Ledesma O. V., De Ruiz Holgado A. P., Olivier G., De Giori G. S., Raibaud P et Galpin J. V.** 1977. A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 42 : 123-133.
- 139. Archibald F. S. et Fridovich I.** 1982. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Bioch. Biophys.* 215 : 589-596.
- 140. Eck A et Gillis J.C.** 1997. Le fromage, de la science à l'assurance qualité ; 3^{ème} Ed Lavoisier. (Paris). 891 p.
- 141. Zabriskie D.W., Armiger W.B., Philips D.H et Albano P.A.** 1982. Traders guide to Fermentation Media Formulation. Traders Protéin. Memphis. TN. [142] **Oh H., Y.J. Wee Y.J., Yun J.S., Han S.H., Jung S. et Ryu H.W.** 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials, *Bioresour. Technol.* 96. pp. 1492–1498.
- 143. Perry J. J., Lory S et Stanley J. T.** 2004. Microbiologie ; Ed Dunod (Paris). 891 p.
- 144. M.K. Dubois et al. (1956).** 'Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances', *Anal. and Chem. Jour.*, 28, 350.
- 145. Mathieu J.** 1997. Initiation à la physicochimie du lait ; guides technologiques des IAA. Technique et Documentation. Lavoisier (Paris). 201p.

- 146. Marshall, V. M., H. Dunn, M. Elvin, N. McLay, Y. Gu, and A. P. Laws. 2001a.** Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. Carbohydr. Res. 331:413–422
- 147. Girrafa.,G et Bergère ,JL 1987** Le lait.67,285-289
- 148. Elliker P.R., Anderson A.W., Hannesson G., 1956.** An agar culture medium for lactic streptococci and lactobacilli.J.dairy Sci.39,1611-1612.
- 149. Akin, H., 2008.** Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins :modélisation et interprétation métabolique. Thèse doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, option : Génie des Procédés et Environnement, 121 p.
- 150. Wee.Y.J.J.S., Yun. D., Kim et H.W. Ryu. 2006.** Batch and repeated batch production of L (+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolysate and corn steep liquor. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33 : 431-435.
- 151. Gassem M.A., Schmidt K.A., Frank J.F. (1997a)** Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J Food Sci 62: 171-174, 207.
- 152. Mozzi F., de Giori G.S., Oliver G., de Valdez G.F. (1994)** Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. Milchwissen 49: 667-670.
- 153. Mozzi F., de Giori G.S., Oliver G., de Valdez G.F. (1996b)** Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnol Lett 10: 435-439.
- 154. Gamar-Nourani L., Blondeau K., Simonet J.-M. (1998)** Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J Appl Microbiol 85: 664-672.
- 155. Grobben G.J., Chin-Joe I., Kitzen V.A., Boels I.C., Boer F., Sikkema J., Smith M.R., de Bont J.A.M. (1998)** Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Appl Environ Microbiol 64: 1333-1337.
- 156. Petry S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J., Desmazeaud M. (2000)** Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. Appl Environ Microbiol 66: 3427-3431

157. Petit, C., Grill, J.-P., Maazouzi, N. and Marczak, R. (1991) Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 216–221.

158. Bertrand N., Fliss I., Lacroix C. (2001) High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719. *Int Dairy J* 11: 953-960.

159. De Vuyst L., Degeest B. (1999a) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Technological bottlenecks and practical solutions. *Macromol Symp* 140: 31-41.

160. Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M., Zoon P. (2002b) Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *Int Dairy J* 12: 689-695.