

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem

Faculté des Sciences de la
Nature et de la vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département des sciences alimentaires

Mémoire de fin d'études

Présenté par :

LAOUEZ Ahlem

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences alimentaires

Spécialité : Production et transformation laitières

Thème

Etude des potentiels probiotiques et technologiques
des lactobacilles

La date de dépôt : 25/10/2022

Devant les membres du jury

Président

H. TAHLAITI

M.C.A/U. Mostaganem

Examineur

N. HENNI

M.C.B/U. Mostaganem

Directrice de mémoire

M. HOMRANI

M.A.B/U. Mostaganem

Travail réalisé à la ferme expérimentale « élevage » et au laboratoire de recherche des sciences
et technique de production animale de l'Université de Mostaganem

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Avant tout je remercie Allah, le tout puissant, de nous avoir donné, le courage, la force, La santé et la persistance.

Je tiens à remercier exceptionnellement ma directrice de mémoire Madame HOMRANI Mounia pour son soutien permanent, pour ses conseils, ses orientations, son aide et surtout pour sa patience énorme.

Je remercie vivement Madame HENNI et Madame THALAITI, de m'avoir honoré pour présider ce jury.

Un remerciement très particulier aux Ingénieurs de laboratoire pour leur aide et leurs infinies gentillesse.

Enfin, nous ne pouvons pas terminer sans remercier tous nos

Camarades de la promotion (2021/2022)

Merci à tous !

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ma gratitude envers vous, pour tous les sacrifices que vous n'avais cessé de me donner. Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que DIEU vous protège et vous donne la bonne santé.

Merci beaucoup Papa et Mama je vous aime beaucoup.

Ma sœur LAOUEZ Hajer et tous mes amies BERRAHAL Naima je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi mes sœurs.

Enfin, à ma promotion de Master en production et transformation laitière 2022.

Résumé :

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation, L'objectif dans notre travail est l'évaluation du potentiel probiotique et des aptitudes technologiques de certaines souches de *Lactobacillus plantarum*.

Dans un premier temps nous avons confirmé l'appartenance de ses bactéries au genre *Lactobacillus* par l'observation de l'aspect macroscopique, le test de catalase et la coloration de Gram. Par la suite, nous avons testé leurs aptitudes technologiques à savoir : Le pouvoir acidifiant, texturant, aromatisant, protéolytique, lipolytique et la production d'EPS ; et enfin nous avons déterminé leurs effets probiotiques par l'évaluation de leurs capacités à résister à l'acidité, aux sels biliaires.

Les résultats ont révélé que les souches étudiées présentent une acidification moyenne. La majorité des souches produisent des arômes et des EPS, présentent un pouvoir protéolytique et texturant. Aucune souche ne présente une activité lipolytique. Les aptitudes probiotiques des souches de *Lactobacillus plantarum* étudiées se sont révélées très intéressantes particulièrement la souche LB3. En conclusion, on peut dire que les souches de *Lactobacillus plantarum* testées révèlent de bonnes propriétés technologiques et probiotiques et peuvent donc être exploitées dans l'industrie agroalimentaire et plus particulièrement laitière.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, effets probiotiques, aptitudes technologiques

Abstract

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our food. The objective of our work is to assess the probiotic potential and the technological aptitudes of certain strains of *Lactobacillus plantarum*.

At first we confirmed the belonging of its bacteria to the *Lactobacillus* genus by observing the macroscopic appearance, the catalase test and the Gram stain. Subsequently, we tested their technological skills, namely: The acidifying, texturing, flavoring, proteolytic, lipolytic power and the production of EPS; and finally we determined their probiotic effects by evaluating their ability to resist acidity and bile salts.

The results revealed that the studied strains show an average acidification. The majority of the strains produce aromas and EPS and have a proteolytic and texturizing power. No strain exhibits lipolytic activity. The probiotic abilities of the *Lactobacillus plantarum* strains studied proved to be very interesting, particularly the LB3 strain. In conclusion, it can be said that the strains of *Lactobacillus plantarum* tested reveal good technological and probiotic properties and can therefore be used in the food industry and more particularly in the dairy industry.

Keywords : Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, probiotic effects, technological aptitudes

ملخص:

تعد بكتيريا حمض اللاكتيك جزءًا طبيعيًا من بيئتنا وغذائنا، والهدف من عملنا هو تقييم إمكانات الكائنات الحية المجهرية والقدرات التكنولوجية لبعض سلالات *Lactobacillus plantarum*.

في البداية ، تأكدنا من انتماء البكتيريا إلى جنس *Lactobacillus*

من خلال مراقبة المظهر العياني واختبار الكاتلاز وصبغة غرام. بعد ذلك ، قمنا باختبار مهاراتهم التكنولوجية ، وهي: التخمير، والقوام ، والنكهة ، والمحلل للبروتين ، وقوة تحلل الدهون ، وإنتاج البوليسترين الممدد. وأخيرًا حددنا تأثيرات البروبيوتيك الخاصة بهم من خلال تقييم قدرتها على مقاومة الحموضة والأملاح الصفراوية.

أظهرت النتائج أن السلالات المدروسة أظهرت تحمض متوسط. غالبية السلالات تنتج و EPS و لها قوة تحلل و التركيب.

لا يوجد إجهاد يعرض نشاط تحلل الدهون.

اثبتت قدرات الكائنات الحية المجهرية لبعض سلالات *Lactobacillus plantarum* المدروسة انها مثيرة للاهتمام للغاية ،

لا سيما سلالة LB3 .

في الختام ، يمكن القول ان سلالات *Lactobacillus plantarum* المعزولة من العسل تكشف عن خصائص تكنولوجية و

بروبيوتيك جيدة ، و بالتالي يمكن استخدامها في صناعة الاغذية و خاصة في صناعة الالبان.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، *Lactobacillus plantarum* ، تأثيرات الكائنات الحية المجهرية ، القدرات التكنولوجية.

Liste des abréviations :

° **D** : Dornic

° **C** : degré Celsius

B.L : Bactéries lactiques

En : *Enterococcus*

EPS : Exopolysaccharide

FAO : Food and Agriculture Organization

H : Heure

Lb : *Lactobacillus*

Ln : *Leuconostoc*

MRS : Man, Rogosa et Sharpe (Milieu de culture)

Na OH : Hydroxyde de sodium

PCA : plate Count Agar (Milieu de culture)

PH : Potentiel d'hydrogène

SB : Sels Biliaire

Listes des figures :

Figure 1 : Le système perméase.....	5
Figure 2 : Le système PTS.....	6
Figure 3 : Principale étape de métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.....	8
Figure 4 : Les voies fermentaires de la dégradation du glucose chez bactéries lactiques.....	10
Figure 5 : Arbre phylogénétique des principaux genres des bactéries lactiques.....	10
Figure 6 : <i>Lactobacillus</i> au microscope optique.....	13
Figure 7 : <i>Enterococcus</i> au microscope optique.....	13
Figure 8 : <i>Leucnostonoc</i> au microscope électronique.....	13
Figure 9 : <i>Lactococcus</i> au microscope électronique.....	13
Figure 10 : <i>Pédicococcus</i> au microscope électronique.....	13
Figure 11 : Bifidobacterium au microscope électronique.....	13
Figure 12 : Observation macroscopique des <i>Lactobacillus plantarum</i> dans le milieu MRS liquide ..29	
Figure 13 : Observation macroscopique des colonies de <i>Lactobacillus plantarum</i> (LB 9) sur milieu MRS agar	29
Figure 14 : Observation microscopique de <i>Lactobacillus plantarum</i> après coloration de Gram	30
Figure 15 : Variation du pH en fonction du temps des souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
Figure 16 : Cinétique d'acidification des souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	35
Figure 17 : Résultats obtenus pour l'activité protéolytique des <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
Figure 18 : Observation des résultats de la lipolyse des souches de <i>Lb. plantarum</i>	39
Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu MSE hyper-saccharosé	40
Figure 20 : Observation des résultats de la Production d'acétoïne des souche <i>Lactobacillus</i> dans le milieu Clark et Lubs.....	36
Figure 21 : Résultats de la résistance des souches de <i>Lb. plantarum</i> aux milieux acides.....	37
Figure 22 : Résultats de la résistance des souches de <i>Lb. plantarum</i> aux sels biliaires.....	39
Figure 23 : Résultats de croissance des souches <i>Lb. plantarum</i> dans le milieu MRS.....	40

Liste des tableaux :

Tableau I : Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (kandler et weiss, 1986).....	11
Tableau II : Critères de sélection utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen <i>et al.</i> , 2004).....	19
Tableau III : Résultats de la pré-identification des souches <i>Lactobacillus plantarus</i>	30
Tableau IV : Activité protéolytique des souches <i>Lactobacillus plantarum</i> étudiées	34
Tableau V : Production des EPS par les souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	35
Tableau VI : Résultats de la Production d'acétoïne par les souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
Tableau VII : Suivi du pH et de l'acidité dornic (°D) des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i>	47

Liste des annexes

Annexe A : Les milieux de culture

Annexe B : Les étapes de la coloration de Gram

Annexe C : La liste du matériel utilisé

Table des matières

Listes des abréviations	
Listes des tableaux	
Listes des figures	
Listes des annexes	
Résumé	
Introduction.....	1
Première partie : Synthèse bibliographique.....	2
Chapitre I : Généralité sur les bactéries lactiques.....	3
1. Définition des bactéries lactiques	4
2. Origine et habitat des bactéries lactiques.....	4
3. Physiologie et métabolisme	4
3.1. Transport du sucre	4
3.2. Le système perméase.....	5
3.3. Le système PTS	5
4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	6
4.1. La protéolyse.....	6
4.2. Métabolisme des sucres	7
4.3. La Lipolyse	7
5. Principales voies fermentaires	8
5.1. La voie homofermentaire ou EMP	8
5.2. La voie hétérofermentaire	9
5.3. La voie fermentaire bifide	9
6. Les différents genres de bactéries lactiques.....	10
6.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	11
6.2. Le genre <i>Enterococcus</i>	11
6.3. Le genre <i>Lactococcus</i>	12
6.4. Le genre <i>Leuconostoc</i>	12
6.5. Le genre <i>Pediococcus</i>	12
6.5. Le genre <i>Streptococcus</i>	12
6.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	12

7. Intérêt des Bactéries Lactiques en Alimentation	13
Chapitre II : Propriétés technologique et probiotique de bactéries lactiques.....	15
1. Propriété technologique	16
1.1. Aptitude acidifiante et production d'acide lactique	16
1.2. Aptitude lipolytique.....	16
1.3. Aptitudes protéolytiques.....	17
1.4. Pouvoir aromatisant	17
1.5. Pouvoir texturant.....	17
2. Propriétés probiotiques des bactéries lactiques	17
2.1. Définition du concept probiotique sur la santé	17
2.2. Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé	18
2.3. Critères de sélection de bactéries lactiques probiotiques	18
2.4. Les propriétés fonctionnelles.....	18
2.4.1. Activité antimicrobienne.....	18
2.4.2. Adhésion aux cellules intestinales.....	18
2.5 Les propriétés technologiques	19
3. Emploi des bactéries lactiques probiotiques dans les produits laitiers	20
Deuxième Partie Etude expérimentale.....	21
Chapitre III : Matériel et méthodes.....	22
1. Lieu et durée du travail.....	23
2. Objectifs de l'étude.....	23
3. Appareillage.....	23
4. Produits chimiques et réactifs.....	23
5. Matériel Biologique	23
5.1.Souches de <i>Lactobacillus plantarum</i>	23
5.2. Les Milieux de culture.....	23
6. Méthodes.....	24
6.1.Revivification des souches lactiques.....	24
6.2. Purification des souches.....	24
6.3.Confirmation de l'appartenance au groupe lactique.....	24
6.3.1.Caractéristique macroscopique.....	24

2.3.2. Caractérisation microscopique.....	24
6.3.3. Test de production de catalase	24
6.4. Etude des aptitudes technologiques des <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
6.4.1. Pouvoir acidifiant.....	25
6.4.2. Pouvoir protéolytique.....	25
6.4.3. Activité lipolytique	25
6.4. 4. Pouvoir texturant (Production d'exopolysaccharides ou EPS).....	26
6.4.5. Pouvoir aromatisant (Production d'acétoïne).....	26
6.5. Etude du potentiel probiotique.....	26
6.5.1. Résistance à l'acidité gastrique.....	26
6.5.2.Résistance aux sels biliaires	26
Chapitre IV :Résultats et discussion.....	28
1. Examen macroscopique	29
2. Examen microscopique.....	29
3. Test de production de catalase.....	30
4. Etude des aptitudes technologiques des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
4.1. Cinétique d'acidification.....	31
4.2. Pouvoir protéolytique.....	32
4.3. Activité lipolytique	34
4.4. Pouvoir texturant.....	35
4.5. Pouvoir aromatisant	36
5. Etude du potentiel probiotique.....	37
5.1. Résistance à l'acidité gastrique.....	37
5.2. Résistance aux sels biliaires	38
Conclusion.....	41
Annexe A	44
Annexe B.....	47
Annexe C.....	48
Références Bibliographiques	50

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques. Parmi ces microorganismes le genre *Lactobacillus* est le plus répandu. Cette bactérie ainsi que d'autres bactéries lactiques sont utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elle permet de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995). En effet, plusieurs études ont démontré la capacité de certaines bactéries lactiques à produire de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le d'acétyle et les bactériocines. De plus, ces bactéries sont largement utilisées dans l'industrie laitière comme ferments acidifiants et comme producteur d'arôme.

Par ailleurs, En raison de leurs bienfaits pour la santé certaines bactéries lactiques sont largement utilisés comme probiotiques. Ces derniers sont définis comme des micro-organismes vivants conférant des bienfaits pour la santé aux hôtes. (Lallali *et al.*, 2018). Les bactéries lactiques les plus couramment utilisées en tant que probiotique sont les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Bessila, 2020). Cependant, d'autres genres de souches probiotiques sont de plus en plus étudiées (Burno, 2012). Il est bien établi que certaines souches probiotiques peuvent être particulièrement bien adaptées au traitement maladies humaines spécifiques. En outre, les souches probiotiques introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires (dans les produits non-fermentés) et qui vont s'implanter dans le tube digestif, peuvent interagir avec la flore intestinale, les cellules épithéliales intestinales et dans une moindre mesure les cellules immunitaires (bechachha *et al.*, 2020).

Le présent travail a pour objectif d'étudier le potentiel probiotique et technologique de certaines souches de bactéries lactiques.

Première partie :
Revue bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur les
bactéries lactiques

1. Définition des bactéries lactiques

Ce sont des cellules procaryotes, organotrophes constituent un groupe hétérogène de micro-organisme est classée dans l'ordre taxonomique des lactobacilles et réalisent la fermentation ; c'est-à-dire une réaction dans transformation du lactose en acide lactique. Ces microorganismes sont de forme cocci ou bâtonnets, à Gram positif, asporulantes, areo-anaerobie facultative on micro-aérophiles généralement immobiles, acido-tolérantes est capable de croître à des températures compris entre 10°C et 45°C (Salminen S et *al*, 2004)

Les B.L (Bactéries lactiques) ont la réputation d'avoir des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes facteur de croissance telle que vitamine b acides aminés peptide basse puriques et pyrimidiques rendant parfois leur culture fastidieuse en laboratoire. Elles sont caractérisées par une faible capacité de biosynthèse (Corrieu et Loquet, 2008). De plus ces microorganismes ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni Cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence De catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des Milieux riches en hème (Larpen et *al*.1997). La production d'acide lactique par les B.L conduisant à un Abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie Agroalimentaire.

2. Origine et habitat des bactéries lactiques

Les B.L sont Ubiquiste, elles ont pour Habitat de nombreux milieux naturels, mais se trouve généralement associé à des aliments riches en sucre simple peuvent être isolé dans les plantes les fruits intacts décomposition le lit fromage et produit litière les vitamines et les poissons fermentés généralement dans le tractus intestinales (Konig et frohlich, 2009).

3. Physiologie et métabolisme

3.1. Transport du sucre

La membrane cytoplasmique des cellules est imperméable à de nombreux composés et peut donc entraver la pénétration des substrats utiles. Cette particularité est indispensable aux bactéries car une membrane exagérément perméable laisserait s'échapper des composants cellulaires précieux comme l'ATP, les nucléotides ou encore des intermédiaires métaboliques, de plus le maintien d'un potentiel membranaire deviendrait alors impossible. La membrane, structure hydrophobe, laisse donc pénétrer dans la cellule les composés apolaires par diffusion mais se révèle Imperméable aux composés polaires hydratés comme les sucres (Brahimi, 2015). Ainsi, l'entrée de ces derniers

solutés nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Chez la plupart des bactéries lactiques, deux sont particulièrement importants, le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le Transport et la phosphorylation du glucide et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les sucres sous forme libre (Reynaud, 2006).

3.2. Le système perméase

Ce système est basé sur la théorie chimiosmotique de Mitchell 1973. D'après ce concept, une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons générant ainsi un potentiel électrochimique de protons, appelé force protomotrice, à travers la membrane. Dans ce cas, le transport du sucre est couplé au mouvement de protons le long du gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il peut s'effectuer contre le gradient de concentration du sucre (Fig.1). Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat carboné est phosphorylé grâce à une kinase ATP-dépendante puis va être dégradé (Reynaud, 2006).

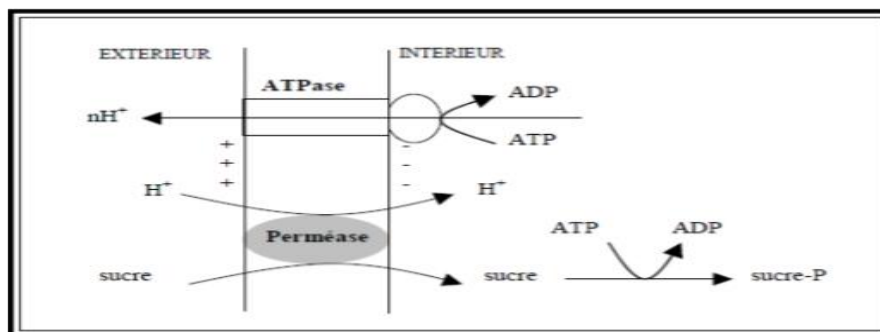


Figure 1 : Le système perméase

3.3. Le système PTS

Le système PTS (phosphotransférase PEP-dépendant) (Fig.2) est impliqué dans le transport de divers hydrates de carbone chez les bactéries. Il s'agit d'un groupe de translocation qui catalyse de façon concomitante l'entrée du sucre dans la cellule ainsi que sa phosphorylation (Brahimi,2015).

Différentes protéines sont impliquées dans ce système :

- les deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr, sont communes à tous les systèmes.

- « enzyme II » (EII) : sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport. Chaque perméase EII est constituée de trois (IIA, B, C) ou quatre (IIA, B, C, D) domaines ou protéines selon le système.

Une suite de transferts du groupement phosphoryl du PEP vers le sucre s'effectue au sein du groupe de translocation. Le processus commence avec le transfert du groupement phosphoryl du PEP vers EI puis vers la protéine HPr qui a son tour catalyse la phosphorylation d'EII. Les domaines EIIA et B transfèrent le groupement phosphoryl jusqu'au sucre spécifique (Brahimi, 2015).

- Le système PTS semble énergétiquement plus favorable que le système perméase, en effet, il couple entrée et phosphorylation du sucre avec la dépense d'une molécule de PEP, tandis que l'accumulation du sucre par un système non-PTS nécessite la dépense de plus d'un équivalent ATP car transport et phosphorylation ATP-dépendante sont physiquement séparés (Raynaud *et al.*, 2003).

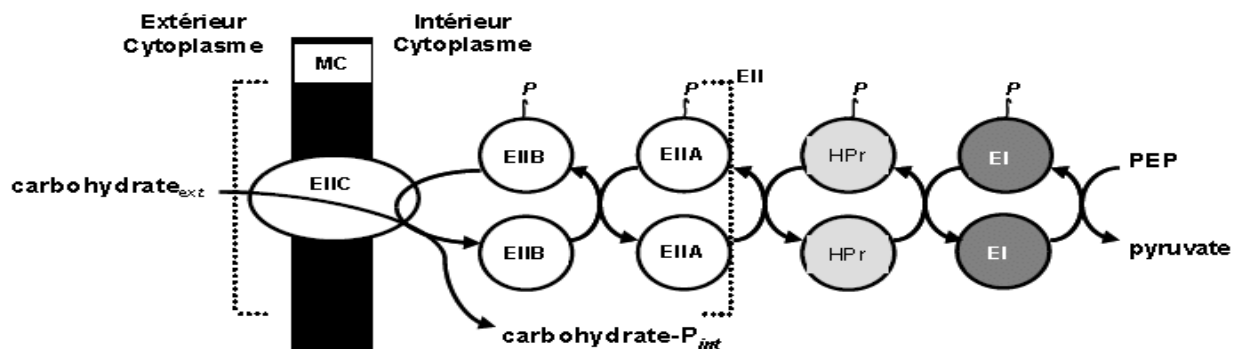


Figure 2 : Le système PTS

4. Métabolisme des bactéries lactiques

4.1. La protéolyse

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse initiale des protéines en peptides. Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en acides aminés et oligopeptides facilement transférables à travers les parois cellulaires. (Belkhir, 2017).

Dans le lait, la dénaturation des caséines laitières conduit à leur précipitation en petits flocons puis en caillé conduisant à la coagulation du lait. La protéolyse dans les produits alimentaires est assurée surtout par les enzymes microbiennes des starters initiaux mésophiles (*Lactococcus lactis* et *Leuconostoc*) ou thermophiles (*Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* et *Streptococcus thermophilus*). Cependant la grande partie de l'activité protéolytique est le résultat des enzymes tardives libérées dans les fromages par la flore additive homofermentaire stricte (*Lb. farciminis*), hétérofermentaire facultative (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus* et *Lb. rhamnosus*) ou hétérofermentaire stricte (*Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. parabuchneri* et *Lb. brevis*) (Belkhir,2017).

4.2. Métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques nécessitent une source d'hydrate de carbone fermentescible pour la production d'énergie cellulaire (ATP) et leur croissance. Le lactose présent dans le lait, disaccharide composé de glucose et de galactose, atteint des concentrations de 4 à 5%.

Chez les lactocoques, le transport membranaire du lactose et du glucose est assuré par le système phosphotransférase-phosphoénol pyruvate dépendant (système PEP-PTS). Le transport du galactose est effectué par le système PEP-PTS et une perméase d'affinité élevée.

Les B.L homofermentaires : transforment tout le glucose en excès en acide lactique. Le transport du glucose ou du lactose vers les cellules diffèrent selon les espèces. Elles utilisent la voie EMP dans la dernière étape de la glycolyse, convertissent le pyruvate en lactate et régénèrent ainsi du NAD⁺ à partir du NADH formé auparavant. Dans cette dernière étape les bactéries font intervenir une lactate-déshydrogénase. (Bekhouche, 2006).

En technologie laitière, l'acidification lactique joue de multiples rôles : elle participe à la coagulation du lait, active la synérèse du caillé et la solubilisation du calcium micellaire qui ont une influence déterminante sur la texture des fromages. Elle contribue aussi aux qualités organoleptiques des produits fermentés et inhibe la croissance des microorganismes nuisibles. Selon la variété de fromage et la flore présente, les produits issus de la glycolyse peuvent être métabolisés selon différentes voies pour la formation de composés aromatiques variés (McSweeney et Sousa, 2000).

4.3. La Lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras

volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de métylketones, alcools, lactones et esters. (Boullouf, 2015).

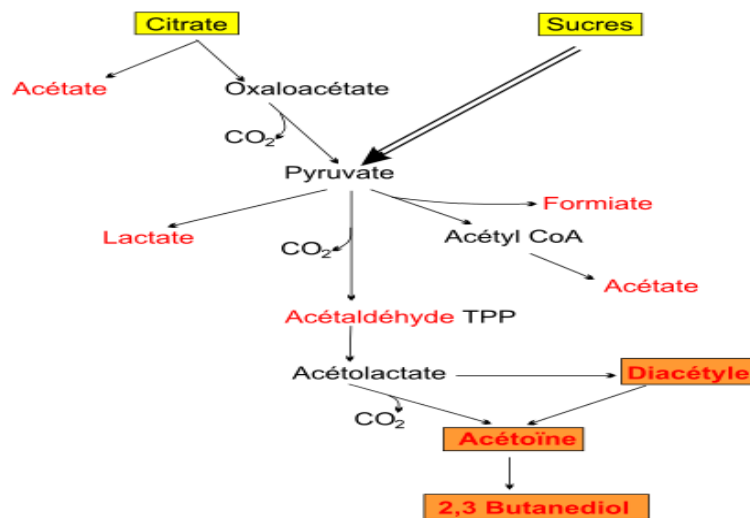


Figure 3 : Principales étapes de métabolisme du citrate par les bactéries lactiques

5. Principales voies fermentaires

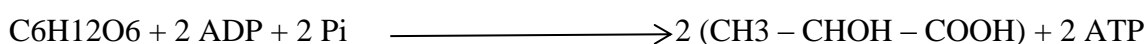
Chez les bactéries lactiques il existe trois types de voies fermentaires différentes : la voie homofermentaire ; la voie hétérofermentaire et la voie bifide.

5.1. La voie homofermentaire ou EMP

Toutes les bactéries lactiques à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus* et certaines espèces du genre *Lactobacillus*, entrent dans la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses.

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase FBA, est un enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaire et indispensable au fonctionnement de la voie EMP.

Glycolyse du glucose en pyruvate puis en lactate dans des conditions appropriées Cette voie aboutit à deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose consommée. La voie doit convertir au moins 90 % du glucose en lactate.



Glucose

Lactate

Mais dans des conditions de croissance défavorables, les bactéries lactiques homozygotes présentent un métabolisme mixte caractérisé par la production d'acide lactique, d'acide acétique,

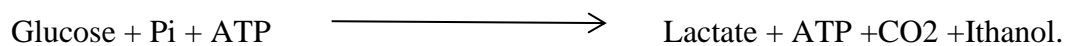
d'éthanol, d'acide formique et/ou de CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes. (Hadeif, 2012)

5.2. La voie hétérofermentaire

Les principaux genres de bactéries lactiques présentant ce type métabolisme sont les *Leuconostocs* et certains Lactobacilles.

Outre l'acide lactique, des quantités significatives de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. La dégradation d'une molécule de glucose conduit à la formation d'une molécule de lactate, une molécule d'éthanol (CH₃CH₂OH), d'un CO₂ et d'un ATP. Une enzyme spécifique de cette voie (la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase) catalyse la dissociation du xylulose-5-phosphate en acétyl-P et glycéraldéhyde-3-phosphate. L'acétyl-P est converti ensuite soit en éthanol soit en acétate selon les besoins en ATP ou NAD⁺. Le glycéraldéhyde-3 phosphate rejoint la glycolyse pour être converti en lactate. En général, les sucres à 5 atomes de carbones (ou pentoses) ne peuvent être métabolisés que par cette voie. Certaines bactéries *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent cette voie hétérofermentaire (Raynaud, 2001).

Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que la métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP (Raynaud, 2001)



5.3. La voie fermentaire bifide

La voie est empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium* ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase (FPC) Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (ketrouci, 2021).

Mise à part le glucose, les autres hexoses (mannose, galactose, fructose) rejoignent en général les voies précédentes après différentes étapes d'isomérisations et de phosphorylation en glucose-6-P et fructose-6-P. Le lactose entre dans la cellule par le système PTS, puis est phosphorylé en lactose-6-phosphate et hydrolysé à l'intérieur de la cellule en glucose et galactose-6-phosphate. Il rejoint finalement la glycolyse au niveau des trioses-phosphate. Les pentoses consommés (ribose, arabinose, Xylose) sont convertis en xylulose-5 phosphate par des réactions de phosphorylation et d'isomérisation ou d'épidémisation.

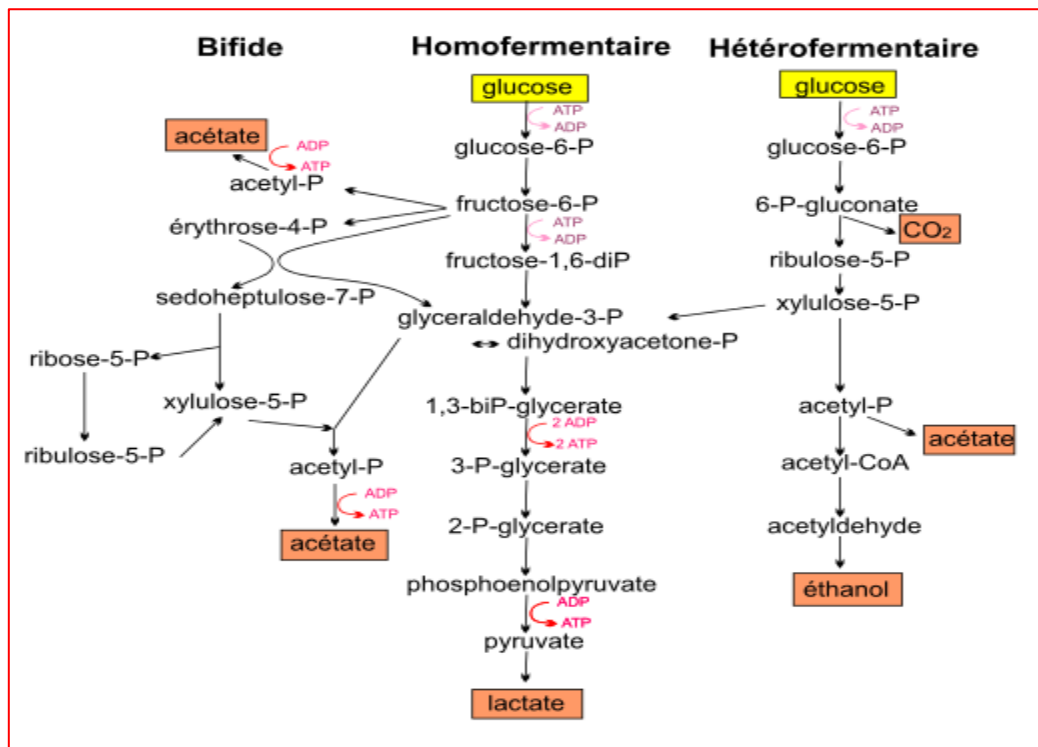


Figure 4 : Les voies fermentaires de la dégradation du glucose chez les bactéries lactiques

6. Les différents genres de bactéries lactiques

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître 12 genres (Figure 5)

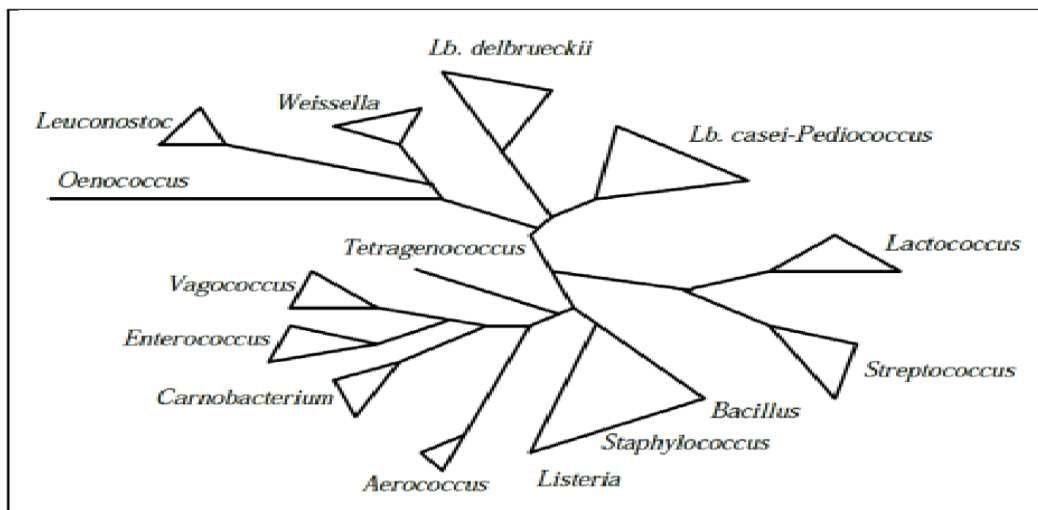


Figure 5: Arbre phylogénétique des principaux genres des bactéries lactiques

6.1. Le genre *Lactobacillus*

Il appartient à la famille des *Lactobacillaceae* contenant aussi les genres *ParaLactobacillus* et *Pediococcus* et comprend 158 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous espèces). Ce sont des bacilles longs et fins souvent regroupés en chaînes (parfois incurvés), ou de cocobacilles dont la

forme est proche de celles des corinébactéries. Généralement immobiles, anaérobies. La production d'acide lactique issue du métabolisme du métabolisme fermentaire représente au moins 50% des produits de fermentation (Axelsson, 1933). Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexe en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides et glucides et sels minéraux. Leur température de croissance est comprise entre 2 et 53 °c avec un optimum entre 30 et 40°C tandis que le pH est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5,5 à 6,2 (De vos *et al.* 2009 ; Zhang et cai 2014).

Selon Desmazeaud. (1998) le genre *Lactobacillus* se subdivise en trois groupes :

Groupe I « *Thermobacterium* » : Il est formé des lactobacilles homofermentaires stricts et thermophile qui se développe à 45°C mais pas à 15°C. Ces espèces ne produisent presque exclusivement que de l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses par glycolyse et ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates (Salminen *et al.*, 2004 ; Zhang et Cai, 2014).

Groupe II « *Streptobactérium* » : Il comprend les lactobacilles homofermentaires facultatif mésophiles qui se développent à 15°. Il est composé d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. Casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum* (Carr *et al.*, 2012).

Groupe III « *Betabacterium* » : Il comprend les espèces ayant un métabolisme strictement hétérofermentaire. Il est par ailleurs, constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum* (Carr *et al.*, 2012).

Tableau 1: Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles (kandler et weiss, 1986)

Caractéristique	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO2 à partir du glucose	-	-	+
CO2 à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldose	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbruckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. savarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. Reuteri</i>

Groupe I : homofermentaire obligatoire ; Groupe II : hétéro fermentaire facultatif ; Groupe III hétéro fermentaire obligation ; *Lb* : *Lactobacillus*.

6.2. Le genre *Enterococcus*

Les *Enterococcus* sont des bactéries de forme cocci, Gram +, catalase -, non sporulées parfois mobiles, aéro-anaérobies (anaérobies aérotoleérantes), généralement homofermentaires, fermentant les sucres sans production de gaz (Chougrani, 2008). Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6,5%

de NaCl, un pH de 9,6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C, avec un optimale de croissance allant de 35°C à 37°C (Zergoug, 2016).

6.3. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis biovar. Diacetylactis* produit le diacétyl. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C (Bouricha, 2017).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoriset* *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot et al, 1996 ; Pot, 2008).

6.4. Le genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* fait partie de la famille des *Leuconostocaceae* qui rassemble deux autres genres (*Weissella* et *Oenococcus*). La température optimale de croissance des leuconostocoques se situe entre 25 et 30°C (Belarbi, 2011).

6.5. Le genre *Pediococcus*

Ce genre appartient à la famille des *Lactobacillaceae*. Il partage son habitat ainsi que plusieurs propriétés physiologiques avec les genres suivants : *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*.

Les cellules de *Pediococcus* sont sphériques, parfois ovoïdes, isolées ou en paires (durant le milieu de la phase exponentielle) ; après leur division dans deux directions perpendiculaires elles forment les tétrades mais jamais les chaînes (De Vos et al., 2009).

6.6. Le genre *Streptococcus*

Ce genre est associé à de nombreuses maladies humaines et animales. L'espèce *Streptococcus thermophilus* est la seule à être adaptée à l'environnement laitier. Elle se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al, 2005).

6.7. Le genre *Bifidobacterium*

Il fait partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologique et biochimique, sa présence dans le même habitat écologique (Axelsson et al, 2004). Ces bactéries ont été découvertes pour la première fois dans les fèces de bébés nourris au lait maternel par Tissier (1900), qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique en « Y » (Zhang et Cai,

2014). Le genre *Bifidobacterium* comprend 41 espèces et 9 sous-espèces. Elles ont été isolées à partir du tractus gastro-intestinal des humains, des animaux et des insectes mais aussi des produits laitiers (Zhang et cai, 2014)

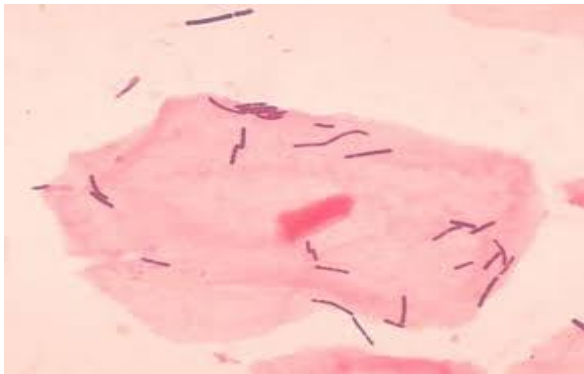


Figure 6 : *Lactobacillus* au microscope optique

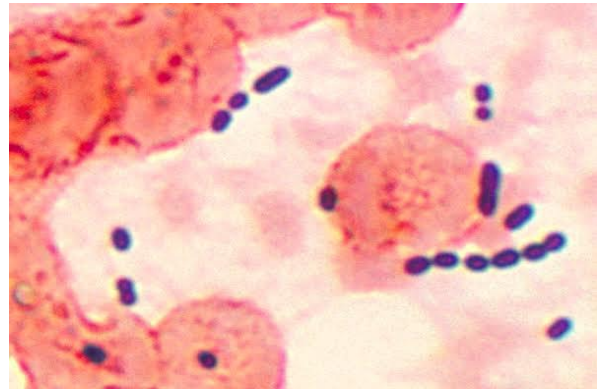


Figure 7 : *Entrococcus* au microscope optique



Figure 8 : *Leucnoscoc* au microscope électronique



Figure 9 : *Lactococcus* au microscope électronique

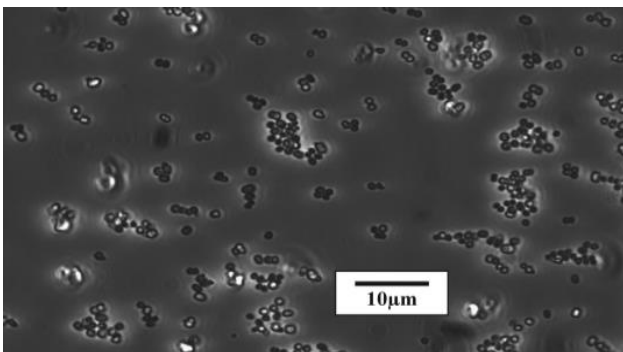


Figure 10 : *Pédicococcus* au microscope électronique

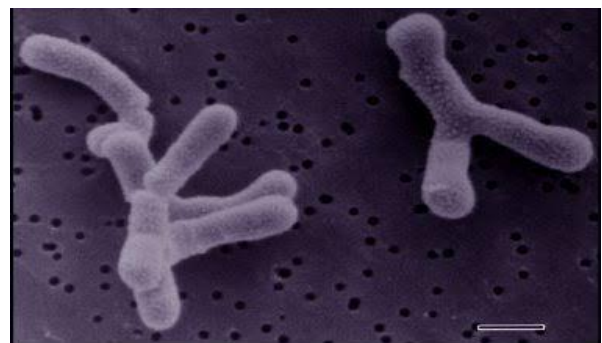


Figure 11 : *Bifidobacterium* au microscope électronique

7. Intérêt des Bactéries Lactiques en Alimentation

Voilà au moins quatre mille ans que l'homme se sert des bactéries lactiques pour la conservation des aliments. Si ces microorganismes sont surtout connus pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés tels que (le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre, le kéfir et

le koumiss), elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (Maghnia, 2011).

La fabrication des laitages implique une fermentation lactique, processus microbien par lequel le lactose (le sucre du lait) est transformé en acide lactique grâce aux B.L. En s'accumulant dans le lait, l'acide lactique modifie les protéines et, par conséquent, la texture du lait. Les qualités et les aspects particuliers qui caractérisent les différents produits sont dus à d'autres variables telles que la température ou la composition du lait (Maghnia,2011). C'est l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique. D'autres sous-produits des bactéries lactiques donnent saveurs et arômes supplémentaires. Par exemple, l'acétaldéhyde donne au yaourt son arôme si caractéristique ; le diacétyl donne une saveur crémeuse à d'autres laitages fermentés (Maghnia, 2011).

Le yaourt est le résultat de la symbiose de deux types de bactéries lactiques qui répondent au doux nom de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Chacune des deux bactéries stimule la croissance de l'autre. Ce lien symbiotique donne un produit différent des produits obtenus par les bactéries simples, prises séparément. Grâce à la symbiose des deux bactéries, la fermentation a lieu plus rapidement que s'il n'y avait qu'une seule espèce de bactérie (Maghnia,2011).

Les produits laitiers fermentés nous donnent aujourd'hui, l'occasion de nous servir des bactéries lactiques comme de cultures probiotiques. Les cultures probiotiques favorisent le bon fonctionnement de notre flore intestinale. Le marché mondial de ces produits se développe de plus en plus, pour répondre aux besoins d'un public de plus en plus à l'écoute de sa forme et de sa santé (Maghnia, 2011).

Chapitre II :
Propriétés technologiques
et probiotiques de bactéries
lactiques

1. Propriété technologique

Les bactéries lactiques montrent une capacité d'adaptation et présentent des activités métaboliques très diversifiées dans différents environnements.

1.1. Aptitude acidifiante et production d'acide lactique

La fonction acide constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Les bactéries lactiques se manifestent par la production d'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de croissance. (Monnet *et al.*, 2008)

Lactococcus lactis subsp. Lactis ; *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* et *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. Diacetylactis*, sont les trois bactéries lactiques les plus fréquemment citées pour leurs aptitudes acidifiantes et leur rôle majeur dans la fermentation de certains aliments. (Lafarge *et al.*, 2004)

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des lactobacilles telles que les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbuecki*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus lactis*, car la quantité produite par ces derniers est largement supérieure à celle fournie par les autres genres utilisés industriellement. (Daniel, 1994)

Les Conséquences physico-chimique et microbiologique de l'acidification des produits fermentés peuvent se résumer ainsi par :

- Accumulation de l'acide lactique participant à la saveur des aliments fermenté.
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires.
- Limitation des risques de développement de Flore pathogène et d'altération dans les produits finaux.
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse (Allouache *et al.*, 2017)

1.2. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les *lactocoques* sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les bactéries du genre *Lactobacillus* et *Streptococcus* présentent des activités lipolytiques faibles par rapport aux lactocoques qui sont considérées plus lipolytique (Beal *et al.*, 2008)

1.3. Aptitudes protéolytiques

La majorité des bactéries lactiques possédant un système protéolytique car elles ne sont pas capables de synthétiser les acides aminés nécessaires (Galia, 2011).

Les aptitudes protéolytiques des bactéries lactiques permettent la catalyse de l'hydrolyse des protéines en peptide qui sont ensuite dégradées par des endopeptidases ou exopeptidase en unités transportables d'acides aminés et de peptides (Lynché *et al.*, 1997).

Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcé que les *lactocoques*.

1.4. Pouvoir aromatisant

Les B.L sont capables de produire de nombreux composés aromatiques qui participent à la qualité organoleptique des produits laitiers tels que le fromage et le yaourt...etc. La plupart des composés aromatiques sont issus du métabolisme du lactose, du citrate et des acides aminés. L'acétoïne et le di-acétyle sont les plus importants composés aromatiques produits par les B.L (Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006)

1.5. Pouvoir texturant

La consistance et la rhéologie des produits transformés dépendent en grande partie de la capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exo-polysaccharides (EPS). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire.

Les espèces *Lactobacillus delbrueckii ssp. Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisées en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007).

2. Propriétés probiotiques des bactéries lactiques

2.1. Définition du concept probiotique sur la santé

Ce terme a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Selon Fuller. (1989) Fuller il est défini comme : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » En 2002 la FAO et l'OMS

lui ont formulé la définition suivante : « microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

2.2. Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé

Plusieurs avantages sur la santé sont attribués à l'ingestion de probiotiques dont certains ont été provoqués scientifiquement et d'autres nécessitent encore des études plus approfondies chez l'homme (Bougurra, 2021). Parmi ces effets bénéfiques, les plus importants sont :

- Amélioration de la digestion du lactose (sécrétion de lactase)
- Réduction des produits du catabolisme, éliminés par le foie et le rein.
- Augmentation de la valeur nutritionnelle (bonne digestion et absorption des minéraux et vitamines.
- Prévention des infections gastro-intestinales ; réduction du risque des diarrhées
- Prévention des ostéoporose, cancer du côlon, hypertension.
- Réduction du taux de cholestérol.

2.3. Critères de sélection de bactéries lactiques probiotiques

Pour qu'un lactobacille (ou tout autre microorganisme) puisse être considéré comme probiotique, et afin qu'il puisse intervenir dans le bon fonctionnement du tractus digestif de l'hôte, il faut qu'il atteigne la muqueuse intestinale à l'état vif (Holzapfel, 2001). Dès l'administration, le micro-organisme doit franchir des barrières et des entraves constitutives du mécanisme de digestion ou de défense de l'hôte. Plusieurs critères de sélection sont requis pour l'authentification d'un probiotique, ces critères englobent : l'origine humaine et la non- pathogénèse ainsi que les aspects technologiques et fonctionnels (Dunne *et al.*, 2001). Les points critiques de sélection d'un microorganisme probiotique se résument donc comme suit :

2.4. Les propriétés fonctionnelles

2.4.1. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/ bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Tahlaiti, 2019).

2.4.2. Adhésion aux cellules intestinales

La capacité d'adhésion à la couche intestinales est un critère incontournable de sélection et recommandé pour le choix des probiotiques. L'adhérence constitue le premier Mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests in vitro puis in vivo en utilisant des cellules D'origine humaine et/ou animale, En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal. (Hadeef, 2012)

Tableau 2 : Critères de sélection utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen *et al.*, 2004)

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité	Survie pendant le passage par l'estomac et le duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide	Production «de barrière acide » efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substances antimicrobiennes	Inhibition du développement des germes Pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation

2.5. Les propriétés technologiques

Des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques (Hadeef, 2012). En effet, les souches probiotiques doivent garder leurs caractéristiques durant tous les procédés de production, de conservation et de distribution. La plupart des définitions des probiotiques, soulignent que les microorganismes doivent être viables et atteindre leur site d'action vivants. Un nombre minimal de 10⁷ cellules viables /g de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Les souches doivent garder leur viabilité sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur la qualité organoleptique du produit Les produits doivent être conservés dans des conditions appropriées, il est nécessaire de contrôler régulièrement l'identité de la souche et ses propriétés. (Belhamra, 2017)

3. Emploi des bactéries lactiques probiotiques dans les produits laitiers

Le genre *Lactobacillus* est l'un des types de bactéries lactiques, le plus courant et se trouve dans les produits laitiers et dans les aliments fermentés tels que le yaourt, et ce type de bactérie aide à traiter la diarrhée et est également utile pour les personnes incapables de digérer le lactose.

Les produits laitiers fermentés sont fabriqués à l'aide de bactéries lactiques. Ces derniers, après les avoir laissés à température ambiante pendant plusieurs heures dans le lait, vont se multiplier et produire en même temps des substances acides conduisant ainsi à la fabrication de lait fermenté tel que le fromage. Il a été prouvé que l'initiateur à utiliser dans la production de dérivés lactés afin d'obtenir un produit fini avec un goût et une saveur désirable doit contenir deux types de bactéries, la première, produit de l'acide lactique tel que *Lactobacillus*, *Streptococcus*, tandis que la seconde est capable de produire des acides volatils qui donnent le goût et la saveur distinctifs tels que ceux du genre *Leuconostoc*. La valeur nutritive du lait fermenté est due au fait qu'il contient tous les composants du lait naturel, à l'exception du lactose, qui est transformé en acide lactique. Cet acide formé est le principal facteur de conservation de ces laits, car il arrête la croissance de bactéries en décomposition et de bactéries pathogènes.

Deuxième Partie

Etude expérimentale

Chapitre III :

Matériel et méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Lieu et durée du travail

Ce travail a été entièrement réalisé au laboratoire de Recherche des Sciences et Technique de Production Animale (LSTPA), situé au niveau de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche affiliée à l'Université Abd-Elhamid Ibn Badis de Mostaganem.

2. Objectifs de l'étude

Cette étude a pour objectif d'évaluer les aptitudes technologiques et les effets probiotiques de certaines souches de *Lactobacillus plantarum*.

3. Appareillage

L'ensemble des appareils utilisés au cours de notre travail est décrit en Annex C.

4. Produits chimiques et réactifs

Les colorants : Violet de gentiane, fuschine

Les réactifs : réactif de Vogues Proskauer (VP1 et VP2)

Les acides et bases : Lugol, La soude dornic (NaOH) N/9, acide chloridrique 1N, Ethanol

Autres : Les sels biliaires ont été utilisés pour étudier le pouvoir des bactéries lactiques à résister à cet inhibiteur dans un milieu liquide., Phénophtaléine, Eau distillée, saccharose.

5. Matériel Biologique

5.1. Les souches de *Lactobacillus plantarum*

Au total neufs souches (N=09) appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* (LB 01, LB 0 2, LB03, LB 04, LB 0 5, LB06, LB 0 7, LB 08, LB 09), isolées à partir de miels crus ont été choisis pour cette étude. Ces souches proviennent de la collection du laboratoire des Sciences et technique de transformation des productions laitières (LSTPA).

5.2. Les Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

Les géloses : MRS (Man Rogosa et Scharpe ,1960) pour la culture des lactobacilles, MSE (Mayeux *et al.*, 1962, Zarour *et al.*, 2017), MRS au triglycérides (Guiraud, 2003) ; MRS additionné de l'huile d'olive et PCA lait à 10% pour l'étude des aptitudes technologiques.

Les bouillons : Clark et Lubs pour l'évaluation des aptitudes technologiques, MRS.

Chapitre III : Matériel et méthodes

6. Méthodes

6.1. Revivification des souches lactiques

Les neuf souches lactiques ayant subi une longue conservation de plus de dix-huit mois ont été revivifiées par ensemencement de 1000 µl de chaque souche conservée dans un tube contenant 5 ml de bouillon MRS suivie d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

6.2. Purification des souches

Les souches lactiques revivifiées ont été purifiées par ensemencement en stries sur gélose MRS et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un résultat uniforme d'un point de vue morphologique.

6.3. Confirmation de l'appartenance au groupe lactique

6.3.1. Caractéristique macroscopique

La détermination des caractères macroscopiques, se fait à l'œil nue. Les souches ont été cultivées sur le milieu gélosé MRS. Cette analyse permet de renseigner sur la couleur, la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité et l'odeur des souches testées.

6.3.2. Caractérisation microscopique

Cet examen permet de décrire la forme et le mode d'association des cellules des souches lactiques utilisées à l'aide d'observation au microscope optique des frottis colorés avec la coloration de Gram (voir annexe) (singleton.1999).

6.3.3. Test de production de catalase

La majorité des bactéries lactiques sont des anaérobies facultatifs et n'ont pas besoin de synthétiser la peroxydase (Larpent, 1997). Afin de confirmer l'appartenance des souches testées au groupe lactique le test de production de catalase été réalisé. La recherche de la catalase est mise en évidence en émulsionnant une colonie à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

Chapitre III : Matériel et méthodes

6.4. Etude des aptitudes technologiques des *Lactobacillus plantarum*

6.4.1. Pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH de différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser l'acidité titrable par la soude (NaOH, N/9) en présence d'un indicateur coloré de pH la phénolphtaléine (Larpent, 1997). L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°Dornic) où 1°Dornic équivaut à 0.1g d'acide lactique/l de lait. Pour réaliser ce test, 100µL de culture jeune de chaque souche lactique a étéensemencée dans un tube contenant 10ml de lait écrémé stérile reconstitué à 12,5%. Après agitation, les mesures sont prises à intervalles de temps 3h, 6h, 24h, et 48h d'incubation à 37°C. puis titrer par la soude Dornic en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1990). L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où :

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans 10ml de lait.

6.4.2. Pouvoir protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique de chacune des souches lactiques, la gélose PCA additionnée de lait 10% de lait écrémé 0% reconstitué à 12,5% a été préparée. Des puits sont ensuite creusés sur la gélose préalablementensemencée par la souche indicatrice. Chaque puit reçoit un volume de 50 µl d'une culture jeune de lactobacille. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures à 48 heures, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques, Le diamètre de la zone de lyse (zone claire) est mesuré en mm (Veuillemard, 1986).

6.4.3. Activité lipolytique

Les isolats qui dégradent le triglycéride sont entourés d'un halo transparent dû au dépôt des cristaux du sel de calcium formés par libération d'acides gras par les enzymes, ou un précipité autour de la colonie dû à la dégradation complète des acides gras (Guessas *et al.*, 2012). La méthode décrite par Veuillemard (1986) a été utilisée pour l'évaluation de l'activité lipolytique. Les souches indicatrices ont étéensemencées dans deux milieux différents, le milieu MRS agar supplémenté de 1% d'huile d'olive et milieu MRS agar supplémenté de 3% tween 80, des puits ont été creusés avec un emporte pièces et sellés par 10 µl de milieu de culture. Les puits recevront 50 µl de culture jeune de souche lactique. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des puits (Guiraud, 2003).

Chapitre III : Matériel et méthodes

6.4.4. Pouvoir texturant (Production d'exopolysaccharides ou EPS)

La production d'EPS à partir du saccharose a été mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux et al., 1962) hypersaccharosé (additionné de 10 % de saccharose). Les souches de lactobacilles ont été ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée. Après incubation à 37° pendant 24 à 48h, la production des exopolysaccharides (dextrane) est détectée par l'apparition des colonies larges, visqueuses et gluantes (Mayeux *et al.*, 1962 ; Benhouina *et al.*, 2019).

6.4.5. Pouvoir aromatisant (Production d'acétoïne)

La capacité des souches à produire des composés aromatisants au cours de leur croissance a été mise en évidence dans le milieu de Clark et Lubs. Chaque tube contenant ce milieu a été ensemencé par une des souches de lactobacille. Après incubation à 37°C pendant 24h à 48h environ 4 gouttes de chacun des réactifs réactif α - naphthol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2) ont été ajoutés suivis d'une agitation rigoureuse. Après 10 minutes, un résultat positif se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface (McCance, 1976 ; Zourari *et al.*, 1991).

6.5. Etude du potentiel probiotique

6.5.1. Résistance à l'acidité gastrique

L'aptitude des souches de *Lactobacillus plantarum* à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par Hassanzadazar *et al.* (2012). Un volume de 1 ml de culture jeunes et fraîche de lactobacille est mis en suspension dans deux tubes différents de 9 ml de bouillon MRS ajustés respectivement à deux pH différents pH= 6,2 (témoin) et pH=2. Après 3h d'incubation à 37°C. La croissance est déterminée par la mesure de la densité optique à 660nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le taux de survie est calculé en comparant la croissance d'une culture bactérienne qui a été exposée aux conditions acides du milieu par rapport à la croissance de la même souche qui a été mise en culture sur milieu MRS à pH 6,2. Deux répétitions sont réalisées pour chaque souche.

6.5.2. Résistance aux sels biliaires

Pour la détermination de l'aptitude des souches de *Lactobacillus plantarum* à résister à la bile, la méthode décrite par (Hassanzadazar *et al.*, 2012) a été appliquée. Un volume de 9mL de milieu MRS à pH 6,2 additionné de 0,3% de sels biliaires est inoculé par 1mL de culture jeune de lactobacille. Après 3h d'incubation à 37°C la densité optique est mesurée à 660nm. Pour chaque

Chapitre III : Matériel et méthodes

souche un tube témoin dans lequel 9ml de bouillon MDR à pH 6,2 et sans sels biliaire est inoculé par 1mL de la culture lactique est préparé. Deux répétitions sont réalisées pour chaque souche.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Examen macroscopique

Les caractères culturaux des lactobacilles se présentent comme suit :

- **Sur MRS bouillant** : les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe de bactéries lactiques (Figure 14).
- **Sur MRS gélosé** : Les colonies apparaissent de forme ronde avec un contour régulier, de couleur blanchâtre et crémeuses avec un diamètre vivant entre 2 et 5 mm (Figure 15).

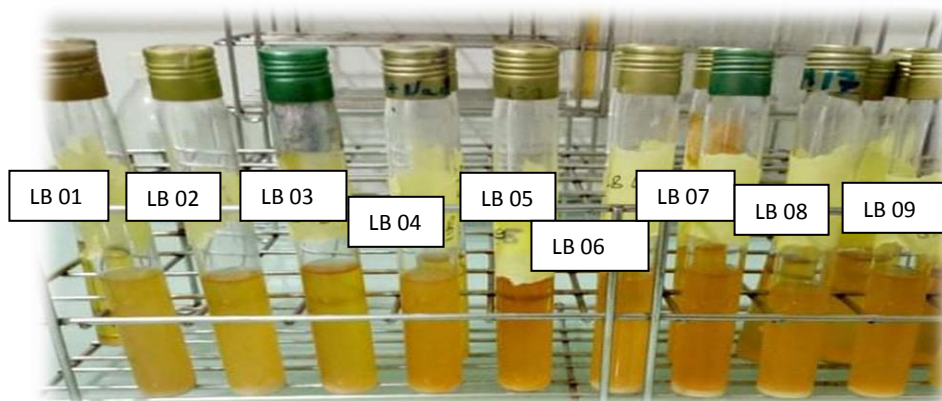


Figure 12 : Observation macroscopique des *Lactobacillus plantarum* dans le milieu MRS liquide

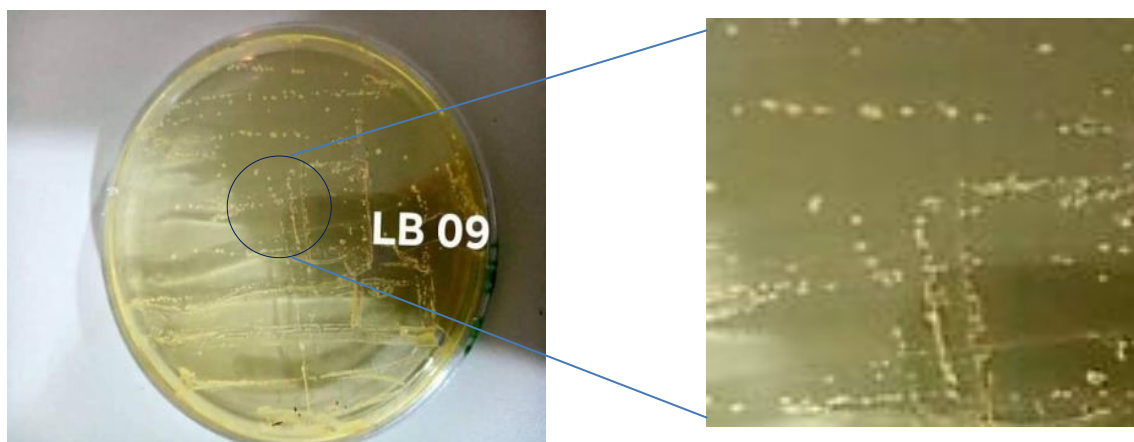


Figure 13 : Observation macroscopique des colonies de *Lactobacillus plantarum* (LB 09) sur milieu MRS agar.

2. Examen microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé que toutes les bactéries étaient de couleur violette (Gram positif) sous forme de courts bâtonnets, disposées en paires ou isolées. (Figure 14)

Chapitre IV : Résultats et discussion

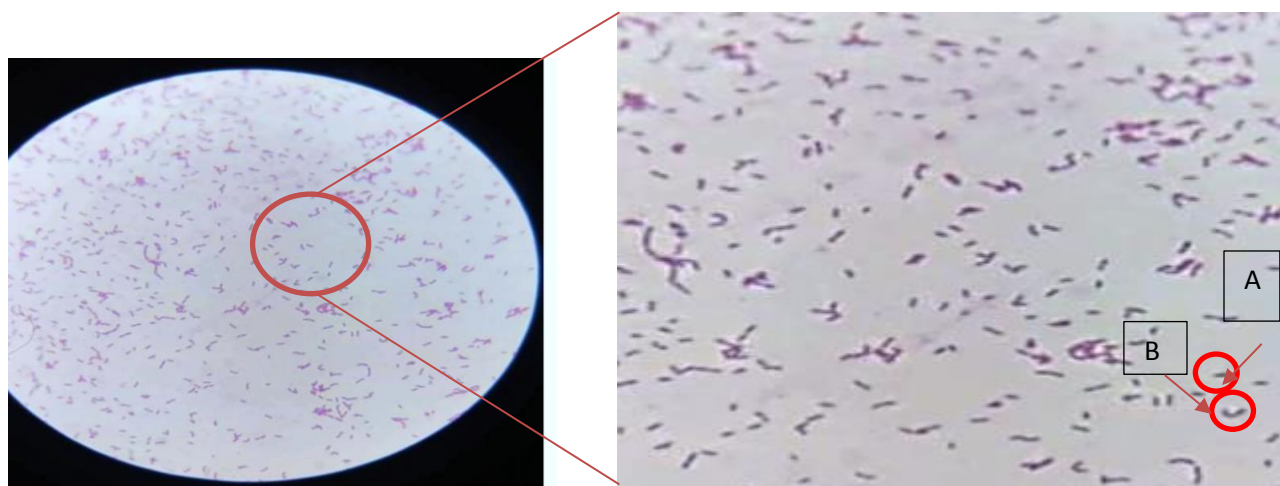


Figure 14 : Observation microscopique de *Lactobacillus plantarum* (LB 01) après coloration de Gram (x1000). A : Bacille disposés en paires, B : bacille isolée.

3. Test de production de catalase

Ce test a révélé que toutes les souches étudiées sont négatives pour la réaction de la catalase. (Tableau 03). Les résultats obtenus de l'examen microscopique et macroscopique ainsi que le test de catalase des souches étudiées tendent à confirmer leur appartenance au genre *Lactobacillus*. (Tableau 03)

Tableau 03 : Résultats de la pré-identification des souches *Lactobacillus plantarum*

Souches <i>Lactobacillus</i>	Test de catalase	Coloration de Gram	Aspect des cellules
<i>LB 01</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 02</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 03</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 04</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 05</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 06</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 07</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 08</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées
<i>LB 09</i>	-	+	Petits Batônnetts disposées en paires/isolées

(+) : positive ; (-) : Négative

Chapitre IV : Résultats et discussion

4. Etude des aptitudes technologiques des souches de *Lactobacillus plantarum*

4.1. Cinétique d'acidification

L'activité acidifiante de neuf souches de *Lactobacillus plantarum* a été évaluée ; par pH-métrie en mesurant le pH (figure 15), et par titrimétrie en mesurant la quantité d'acide lactique produite exprimée en degré Dornic (D°) en fonction du temps (figure 16).

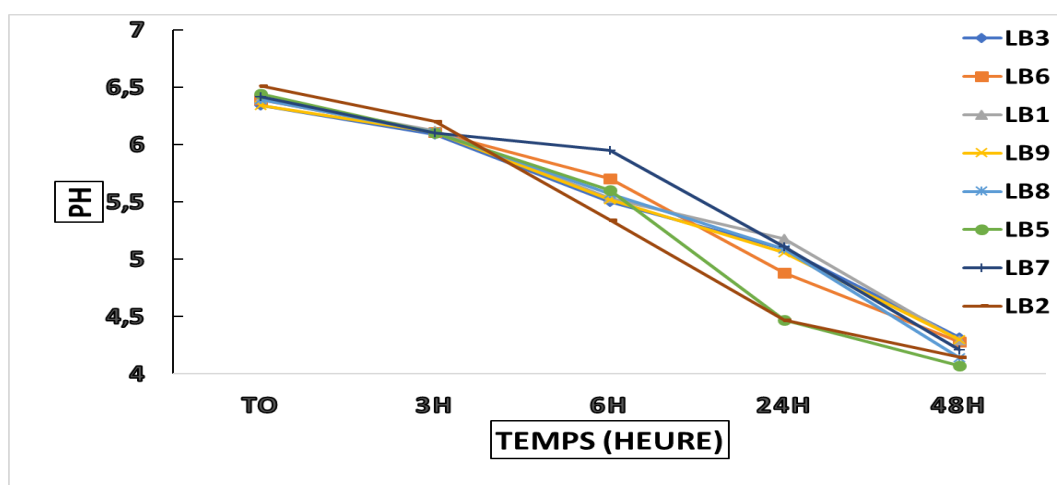


Figure 15 : Variation du pH en fonction du temps des souches *Lactobacillus plantarum*

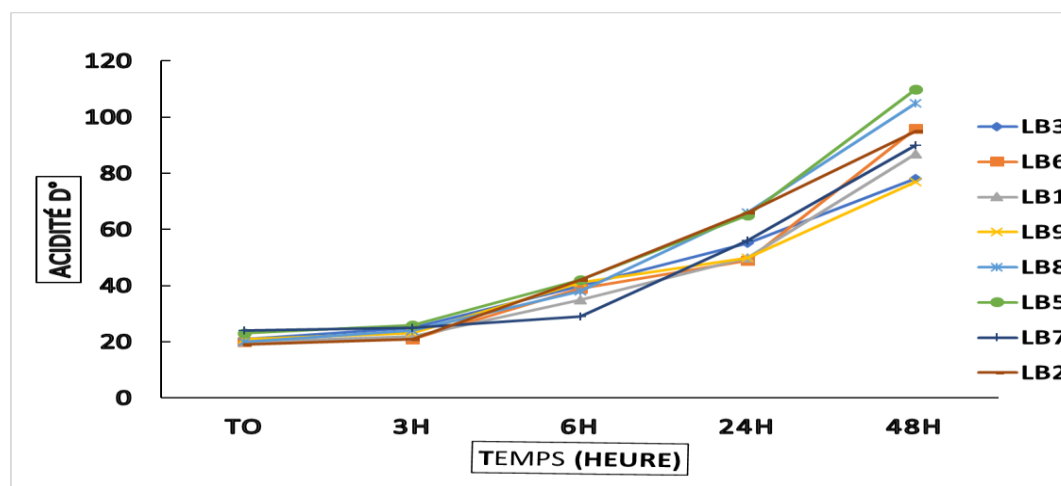


Figure 16 : Cinétique d'acidification des souches *Lactobacillus plantarum*

Il en ressort tout d'abord de ces résultats qu'au cours de 48h d'incubation dans le lait écrémé à 30°C, la totalité des souches testés ont progressivement produit à des concentrations variables de l'acide lactique. Cette production a été accompagnée d'un abaissement du pH. Après 6 heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH 5,34 et pH 5,95 ; en parallèle la quantité de l'acide

Chapitre IV : Résultats et discussion

lactique produite se situe entre g 2,9 et g 4,2 d'acide lactique par litre de lait. Au bout de 24h d'incubation ces valeurs de pH diminuent et se trouvent situées entre pH 4,47 et pH 5,18 ; de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 4,9 et 6,5g/l. A la fin de l'incubation c'est à dire après 48h le pH à atteint une valeur minimale de 4,07 tandis que la quantité d'acide lactique produite à atteint une valeur maximale de 10,1 g/l.

En industrie agroalimentaire La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée chez les bactéries lactiques. La diminution rapide du pH durant les premières heures est d'une importance cruciale lors de la fabrication de certains produits laitiers tel que le fromage. Dans notre étude l'ensemble des souches testés ont montré une vitesse d'acidification lente ($\Delta \text{pH} / \Delta T < 1$) après 6 heures d'incubation dans le lait écrémé. Cependant la capacité d'acidification s'est révélée intéressante pour les souches *LB0 2*, *LB 08* et *LB 05* qui ont pu au bout de 24 heures de fermentation de faire baisser le pH du lait au-delà de pH 5.

Les résultats obtenus de l'acidité produite après 24h d'incubation, nous ont permis de classer nos souches comme moyennement acidifiante étant donné que leur acidité se situe entre 40°D et 79°D. Parmi les bactéries, la souche *LB 08 et LB 05 et LB 02* sont les plus acidifiantes avec respectivement des quantités d'acide lactique produites de 11,5 ; 11 et 9,5 g/l.

De ce fait, nous pouvons dire que les souches *Lactobacillus plantarum* isolées de miels ne semblent pas être de bons candidats pour les utiliser en tant que culture starter en industrie laitière, cependant leur utilisation en tant que culture mixte est possible.

4.2. Pouvoir protéolytique

Les résultats de l'hydrolyse des protéines par les souches *Lactobacillus plantarum* testées, cultivées sur milieu PCA additionné de 10% de lait écrémé (0%) reconstitué à 12,5% sont représentés dans le tableau 8 et figure 27.

Après 24 h d'incubation, toutes les souches lactiques testées ont montré activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo de lyse clair autour des souches ensemencées avec un diamètre allant 8 mm pour la souche *LB2* à $13,67 \pm 0,58$ mm pour la souche *LB 01*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dahou *et al.* (2016), qui ont démontré que les bactéries du genre *Lactobacillus*, isolées à partir de fromages traditionnels de type j'ben présentent un caractère protéolytique. D'après plusieurs études les lactobacilles produisent généralement des protéinases neutres actives sur le α -, β - et κ - caséine mais l'intensité de leur activité est extrêmement variable d'une espèce à une autre (CASTBERG et MORRIS, 1976).

Chapitre IV : Résultats et discussion

Selon Vuilleumard. (1986) une souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Dans notre cas toutes les souches ont montré une activité protéolytique très intéressante avec un diamètre des zones de la protéolyse supérieure à 8 mm, ce qui suggère leur utilité pour une application en fermentation et pouvant être responsables de la libération de peptides et d'acides aminés, impliqués dans la formation de certaines caractéristiques organoleptiques de grande importance dans l'industrie laitière comme la texture et l'aromatisation (Kongo, 2013, Pisano *et al.*, 2015). De plus, l'activité protéolytique des bactéries lactiques et plus particulièrement le genre *Lactobacillus* est essentielle dans la fabrication fromagère ainsi que dans le développement des propriétés organoleptique (Veuilleumard, 1986). Cependant, il est important de prendre en compte que les souches hautement protéolytiques ne sont pas toujours plus adaptées à une utilisation en tant que ferments lactiques. Car, une protéolyse excessive peut provoquer une production incontrôlée de peptides amers et d'autres composés indésirables (Nieto-arribas *et al.* 2009 ; Buffa *et al.*, 2005)

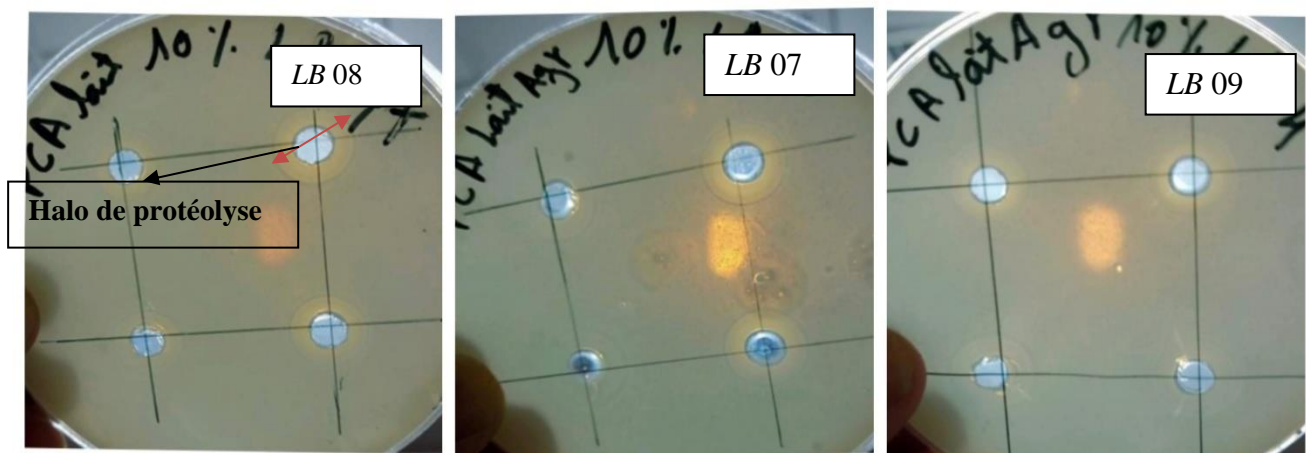


Figure 17 : Observation des résultats obtenus pour l'activité protéolytique des souches de *Lactobacillus plantarum*. LB 08, LB 07, LB 09.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 04 : Activité protéolytique des souches *Lactobacillus plantarum* étudiées

Les souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	Diamètre des zones claires mm (Moyenne \pm Ecart-type)
LB 01	13,67 \pm 0,58
LB 02	8,00
LB 03	11,50 \pm 0,5
LB 04	12,00 \pm 1
LB 05	10,67 \pm 1,53
LB 06	12,67 \pm 0,58
LB 07	12,33 \pm 0,58
LB 08	11,67 \pm 0,58
LB 09	12,67 \pm 1,53

4.3. Activité lipolytique

L'activité lipolytique des souches *Lactobacillus plantarum* testées a été recherchée sur deux milieux, le milieu MRS supplémenté d'un substrat artificiel « tween 80 » et le milieu MRS supplémenté d'un substrat naturel « L'huile d'olive ». La lipolyse se manifeste par la formation d'une zone clair autour des souchesensemencées (Janda, 2005). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 28.

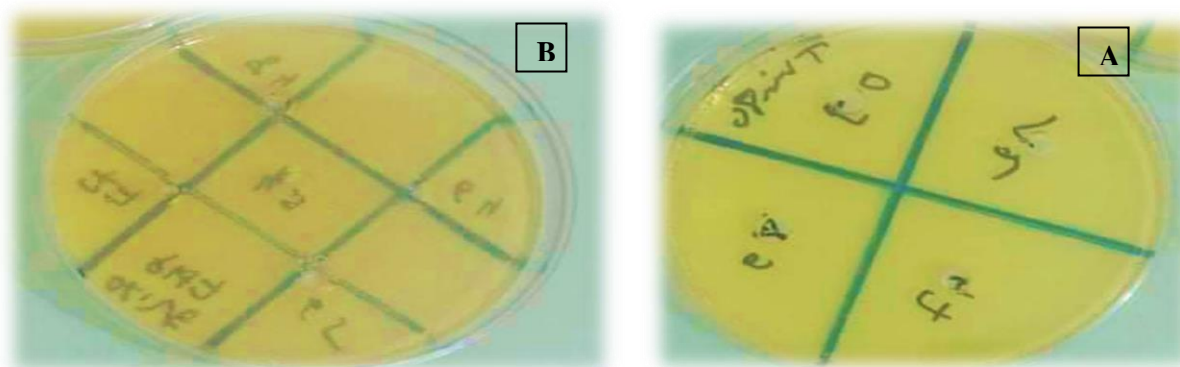


Figure 18 : Observation des résultats de la lipolyse des souches de *Lb. plantarum*. A : Milieu MRS supplémenté de tween 80 ; B : MRS supplémenté de d'huile d'olive.

Nous avons constaté une absence d'activité lipolytique pour toutes les souches testées. D'après Montel *et al.* (1998) les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* sont faiblement lipolytique.

Tout comme l'activité protéolytique, l'activité lipolytique et estérasique, contribue à la maturation, l'aromatisation et la texturisation des fromages. Cependant cette activité n'est pas nécessaire pour la croissance des bactéries lactiques dans le milieu lait (Domingos. 2017).

Chapitre IV : Résultats et discussion

4.4. Pouvoir texturant

La capacité de production des EPS par nos souches a été testé sur milieu MSE additionné de 10% de saccharose. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure28, tableau 9.

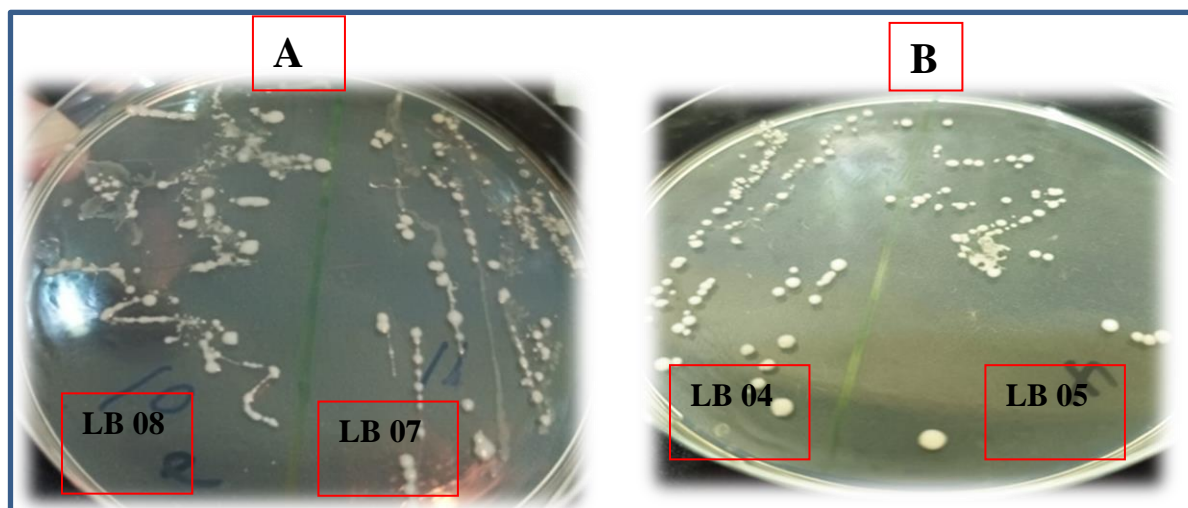


Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu MSE hyper-saccharosé. A : Production d'EPS ; B : Pas de production d'EPS ; EPS : exopolysaccharide.

Tableau 05 : Production des EPS par les souches *Lactobacillus plantarum*

Les souches <i>Lactobacillus plantarum</i>	Production d'EPS
LB 08	+
LB 07	+
LB 02	+
LB 01	+
LB 03	+
LB 04	-
LB 05	-
LB 06	-

(+) : production positive ; (-) Production négative

On constate une bonne croissance des souches sur le milieu hyper-saccharosé, cependant l'aspect des colonies a démontré un pouvoir faible, voire nulle pour certaines souches en production d'EPS vue que l'aspect large est gluant des colonies n'était pas très apparent ou bien carrément absent pour certaines souches (*LB 04*, *LB 05* et *LB 06*).

Ces observations rejoignent les travaux de (Looijesteijn *et al*, 2001) qui ont rapporté qu'au sein d'une même espèce de bactéries lactiques, les résultats peuvent être différents.

Chapitre IV : Résultats et discussion

L'aptitude texturant des *Lactobacillus* est l'un des facteurs les plus importants dans l'industrie laitière, par l'apport des propriétés technologiques recherchées. L'utilisation des souches de *Lactobacillus* productrices d'EPS augmente la viscosité du produit en réformant sa texture et son comportement rhéologique (Leveau., 1993). Les EPS sont des polymères recherchés dans la fabrication des produits laitiers fermentés tels que les yaourts et les fromages pour améliorer leur apparence, leur stabilité ainsi que leurs propriétés rhéologiques (Zarour, 2018).

4.5. Pouvoir aromatisant

La production d'arôme est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitier fermentés. Il apparait que toutes les souches de *Lactobacillus ptarum* testées par la réaction de Vogues Proskauer arrivent à produire des arômes comme l'acétoïne, détecté par l'apparition une coloration rose-rouge intense du milieu Clark et Lubs qui va contribuer aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés à l'excepté de la souche *LB 02* Nos résultats se concorde avec les nombreux travaux (Montville *et al.*, 1987 ; Dahou *et al.*, 2016) qui ont démontré la production d'acétoïne par *Lb. plantarum*.

D'après Hammes et Hertel (2006), certaines bactéries du genre *Lactobacillus* participent à la fermentation malolactique et peuvent par ailleurs, métaboliser le citrate et le pyruvate, produisant l'acétate, le lactate et l'acétoïne. Selon Phalip *et al.*, (1994) ce dernier est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique). Mais il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique (HAMMANI, 2014).

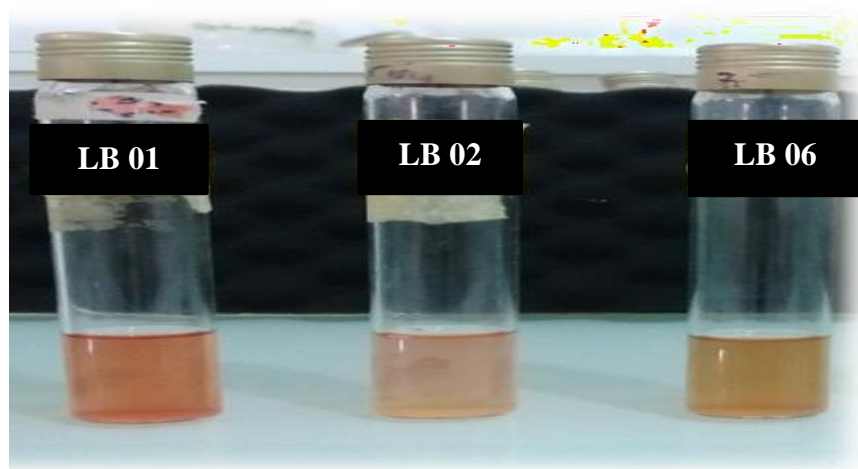


Figure 20 : Observation des résultats de la Production d'acétoïne des souche *Lactobacillus* dans le milieu Clark et Lubs

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 06 : Résultats de la Production d'acétoïne par les souches *Lactobacillus plantarum*

Les souches	Production d'acétoïne
Lb 8	+
Lb 7	+
Lb 5	+
Lb 9	+
Lb 6	-

(+) : Production positive ; (-) : Production négative

5. Etude du potentiel probiotique

5.1. Résistance à l'acidité gastrique

L'étude de l'exposition prolongée de neuf souches de *Lactobacillus plantarum* aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par incubation dans le milieu MRS à pH 2 pendant 3h. La souche témoin *Lactobacillus plantarum* a été mise en culture en même temps sur milieu MRS à pH 6,2 sans sels biliaries. Les résultats obtenus de ce test sont illustrés dans figure 21.

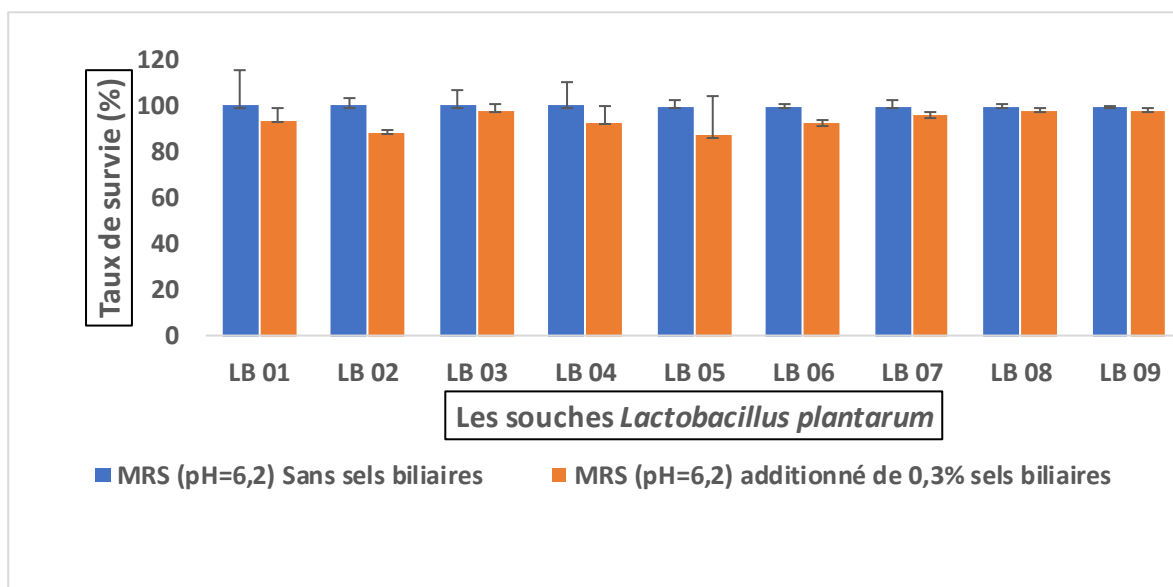


Figure 21 : Résultats de la résistance des souches de *Lb. plantarum* aux milieux acides

L'ensemble des souches ont donné une bonne croissance sur le milieu témoin pH 6,2 qui se traduit par une forte turbidité du milieu, avec en moyenne une densité optique maximale de $2.176\% \pm 0,042$ enregistré chez *LB 06*. Par ailleurs, nous avons constaté une diminution de cette

Chapitre IV : Résultats et discussion

croissance dans le milieu MRS à pH= 2, cependant la majorité des souches ont montré une très bonne résistance au pH bas du milieu avec des taux de survies supérieurs à 60% à l'exception de *LB 05* et *LB 06* qui n'ont pas résister aux conditions du milieu et qui ont enregistré de très faibles taux de survie avec respectivement des valeurs moyennes de $2,84\pm 1,65$ et $1,86\pm 0,36$. Les souches *LB 03*, *LB 04* et *LB 09* ont montré les meilleurs taux de survie avec respectivement des valeurs moyennes de $92,65 \pm 0,69$, $94,3\pm 4,68$ et 93%.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvé par Bennatia (2021) qui a démontré la capacité de certaines souches de *Lactobacillus plantarum* à résister au milieu acide (pH =2) avec un taux de survie allant de $36,41\pm 2,04$ et $94,39\% \pm 0,52$. Selon Tulomoglou *et al.* (2013) la majorité des bactéries lactiques y compris le genres *Lcatobacillus* résiste au pH bas mais avec une diminution de leur viabilité. Belhamri. (2017) a étudiés le potentiel probiotique de dix souches de *Lactobacillus plantarum* isolées des produits laitiers, la résistance aux conditions acides a révélé que toutes les souches ont résisté au pH 3 et 5 ont perdu leur viabilité après 3 heures d'exposition à pH 2.

La tolérance des bactéries à l'acidité est une condition préalable à leur utilisation en co-culture. Elle permet aux souches de survivre pendant de longues périodes dans les aliments très acides, tels que le yaourt, sans une réduction importante dans leur nombre (Minelli *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2010). Les probiotiques doivent également survivre dans le suc gastrique. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résistes à un pH = 2 dans un milieu de culture pendant 3 heures. (Ammor et Mayo, 2007).

5.2. Résistance aux sels biliaires

La tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotique. En effet, les bactéries qui résistent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Par conséquent, la tolérance de neuf souches des *Lactobacillus plantrum* aux sels biliaires a été évalué. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 22.

Chapitre IV : Résultats et discussion

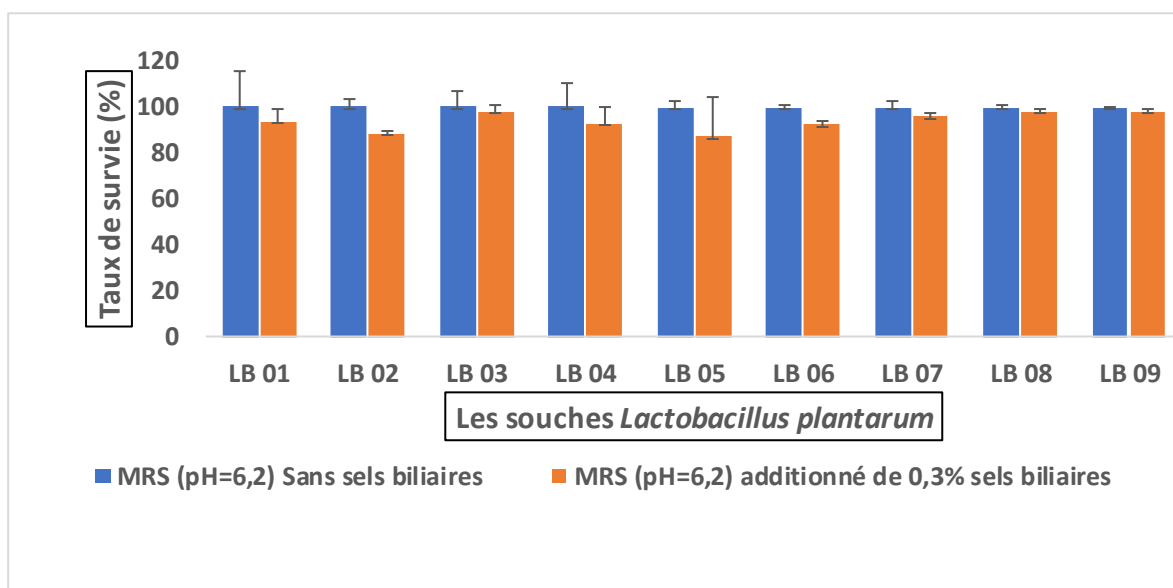
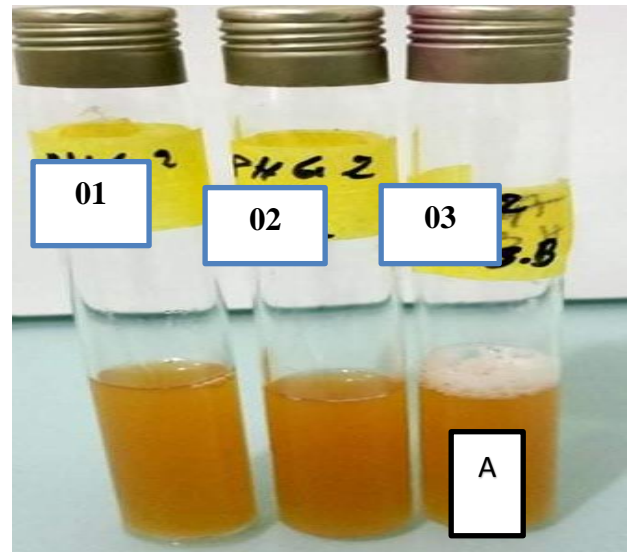
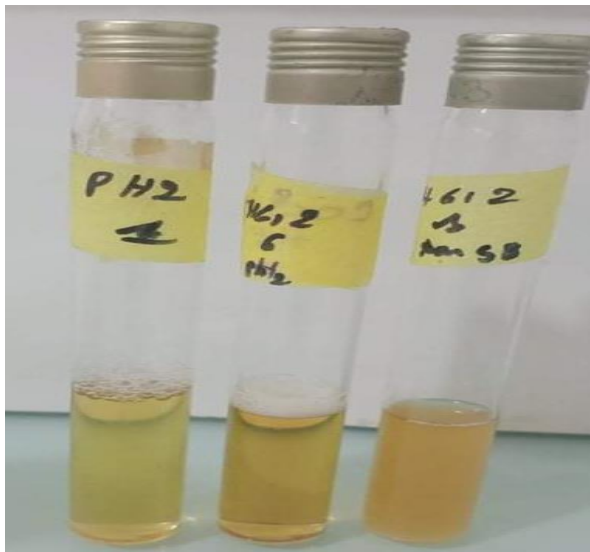


Figure 22 : Résultats de la résistance des souches de *Lb. plantarum* aux sels biliaires

Il apparait que toutes les souches restent viables dans l'environnement simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3%, avec une légère diminution du taux de survie allant de $87,28 \pm 17,34$ pour la souche *LB 05* à $98,28 \pm 2,78$ pour la souche *LB 03*. Nos résultats concordent avec plusieurs études qui ont confirmé que la majorité des bactéries lactiques présente une bonne tolérance aux sels biliaries (Maragkoudakis *et al.*, 2006 ; Benatia, 2021).

La capacité des lactobacilles à croître dans la présence de la bile peut être liée à la capacité des souches à produire la bile hydrolase (BSH) (Tannock *et al.*, 1989), qui est une enzyme responsable de la déconjugaison des sels biliaries.

Chapitre IV : Résultats et discussion



02

Figure 23 : Observation des résultats de croissance des souches *Lb. plantarum* dans le milieu MRS. A : LB 05 ; B : LB 03 ; 1 : Milieu MRS pH 2 ; 2 : MRS pH 6,2 additionnée de 0.3% sels biliaires ; 3 : milieu MRS pH 6,2 sans sels biliaires (témoin)

Conclusion

L'objectif visé de cette étude était d'évaluer certaines propriétés technologiques des souches *Lactobacillus plantarum* et d'étudier leur potentiel probiotique.

Toutes les souches testées ont été caractérisées comme moyennement acidifiante dont 3 (*LB 02*, *LB 05* et *LB 08*), ce sont révélées très intéressante, du fait qu'elles ont pu au bout de 24 heures d'incubation, faire baisser le pH du lait au-delà de pH 5, cependant elles ne semblent pas être de bonnes candidates pour les utiliser en tant que culture starter en industrie laitière, en raison de leur faible vitesse d'acidification pendant les premières 6 heures, mais peuvent être utilisé en culture mixte.

Par, ailleurs la majorité des souches testées produisent des substances aromatiques et présentent une activité protéolytique importante, ainsi qu'un pouvoir texturant. Ces sont des facteurs très important au développement des propriétés organoleptiques des produits laitiers. Aucune des souches testées ne montre une activité lipolytique.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* des aptitudes probiotiques révèlent que la majorité des souches ont montré une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles : acidité, sels biliaries, en particulier la souche *LB 03* qui a montré les meilleurs taux de survie.

Au final, on peut dire que la majorité des souches de *Lactobacillus plantarum* étudiées sont de bonnes candidates pour application en industrie agroalimentaire et plus particulièrement laitière car elles montrent des comportements remarquables vis-à-vis de tous les tests réalisés lors de ce travail.

Cependant, pour compléter ce travail, des études plus approfondies doivent être menées, notamment, en confirmant l'effet probiotique de ces souches, notamment leurs aptitudes à se fixer au niveau des cellules épithéliales intestinales ou encore en évaluant leur activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes et la résistance aux antibiotiques. Il serait également intéressant de faire un essai de fabrication d'un lait fermenté avec les souches ayant montré de bonnes propriétés technologiques

Les annexes

Annexe A

Les milieux de cultures

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe,1960) : Pour l'isolement des bactéries lactiques	
Composant	Quantité
Extraitdelevure	5g
Extraitdeviande	10g
Peptone	10g
Acétatedesodium	5g
Citratedesodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0,2g
MnSO ₄	0,05g
Agar	15g
Eaudistillée q.s.p	1000ml
pH= 6.2 /Autoclavage :120°C pendant 20minutes	

Milieu Bouillon Nutritif : Pour les cultures jeunes des bactéries pathogènes	
Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g

Chlorure de sodium	5g
Eau distillé q.s.p	1000ml
pH=7 / Autoclavage: 120°C pendant 20 minutes	

Milieu PCA	
Peptone de caseine	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Agar	20g
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH=7 / Autoclavage 120°C pendant 20min	
Milieu Clark et Lubs	
Peptone	5g
Glucose	5g
KH ₂ PO ₄	5g
Eau distillée q.s.p	1000ml
pH = 7 / Autoclavage 120°C pendant 20min	
Préparation du lait écrémé	
Poudre de lait 0%	125g
Extrait de levure	3g
Eau distillé q.s.p	1000ml
Autoclavage 110°C pendant 10min	
Milieu MSE hypersaccharosé	
Extrait de levure	5g
Tryptone	10g
Saccharose	100g
Glucose	2.5g
Citrate de sodium	1g
Azide de sodium	0.0075g
Eau distillée q.s.p	1000ml
Agar	18g

pH=6,5 /Autoclavage 121°C pendant 15min	
Milieu aux triglycérides	
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Triglycérides	10g
Agar	15g
Eaudistillée q.s.p	1000ml
pH=6,5 /Autoclavage: 110°C pendant 15min	
Milieu Mueller Hinton	
Extrait de viande	2g
Peptone	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar	15g
pH=7,4 Autoclavage 120°C pendant 20min	

Annexe B

- Les étapes de coloration de Gram
- La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :
- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant uneminute
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30secondes
- Laver à l'eau
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique avec huile d'immersion (×100)
- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe C

Listes de matériel utilisé :



Lait écrémé préparé



Étuve



Autoclave



pH-mètre



Vortex



Plaque chauffante



Microscope. optique



Spectrophotomètre

Références Bibliographiques

ABEE T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram positive bacteria and selfprotection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129, 1-9.

Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L, Theodorou V. 2006. *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress-induced visceral hypersensitivity: a possible action through an interaction with epithelial cells cytoskeleton contraction in rats. *Gut* ,55(8):1990-4.

Allouache K & Smaoun O. 2017. Caractérisation de souches locales de bactéries lactiques isolées à partir de quelques produits laitiers artisanaux et mise au point d'un produit type Raib, mémoire de master. Université A. MIRA - Bejaia, Département de Microbiologie,p 34.

Ammor m.s. et mayo b. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functionalstartercultures in dry sausage production. *Meat. Science*, p 138-146.3.

Axelsson L. 2004. Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects*. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A; Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66. ch1.

Bechachha K & Boudershem R. 2020, Les bactéries lactiques : Rôles et intérêts.Memoire de master.Université 8 Mai 1945 Guelma Faculté des sciences de la nature et de vie, 89p.

Béal C, Marin M., Fontaine E, Fonseca F. Et Obert J.P. 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : *bacteries lactiques, de la genetique aux ferments (corrieu g.et luquet f.m.)*. Tec & doc, lavoisier. Paris.661-765.

Bessila.R et Messaoudi L. 2021.propriétés probiotique des bactéries lactiques , Université de Larbi Tebessi-Tébessa Faculté des science exactes et des sciences de la nature et de la vie.p10-28.

Belhamra Z. 2017. Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 147p.

Belarbi F. 2011 ;Isoloment et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes,Mémoire de Magister ,Université d'Oran Es SENia Faculté des sciences , p 16.

Bechachha K & Boudershem R. 2020, Les bactéries lactiques : Rôles et intérêts.Memoire de master.Université 8 Mai 1945 Guelma Faculté des sciences de la nature et de vie, 89p.

Bekhouche F. 2006. Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires, 149p.

Belkhir K. 2017. Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactiques isolées du lait de chamelle d'Algérie. Réalisation de ferments lactiques, thèse de doctorat. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bela faculté des sciences de la nature et de la vie département de biotechnologie, 198p.

Benhoua I. S, Heumann A, Rieu A, Guzzo J, Kihal M, Bettache G, Champion D, Coelho C & Weidmann S. 2019. Exopolysaccharide produced by *Weissella confusa*: Chemical characterisation, rheology and bioactivity. *International Dairy Journal*, 90, 88-94.

.Bouguerra A. 2021. Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, 141p.

Boullouf A. 2015, Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza »,Magister,Université des freres mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie ,p17

Bouricha H. 2017, Caractérisation du lait cru de la ferme expérimentale de Hassi-Maméche : Précisément la flore thermophile et mésophile, mémoire Master, Université de Mostaganem Faculté des sciences de la nature et de la vie, p30.

Burno EBEL. 2012 ; Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz, thèse doctorant ,Université de Bourgogne – AgroSup Dijon.p9.

Brahimi S. 2015. Isolement et Caractérisation Biotechnologiques des Bactéries Lactiques Isolées à Partir des Margines d'Olives «AMOREDJ » Fermentés, thèse de doctorat. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de science département de biologie, 203p.

Carr F, J, Chill D, et Maida N. 2002. The lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev .Microbiol .*,28 :4,281-370.

Cayot P et Lorient D. 1998. Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

Corrieu G, Luquet FM. 2008. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Collection « Sciences et Techniques Agroalimentaires ». 2ème éditions, P83.

Cholet O. 2006. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire.Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES.

Chemlal-Kheraz D. 2013. Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des science département de biologie, 217p.

Daniel M. 1994. production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum,theq doctorant , institut national polytechnique de lorraine Faculté des Sciences de la Nature et de la vie .p 52.

De Vos P, Garrity G. M, Jones D, Krieg N. R, Ludwig W, Rainey F. A, Schleifer K. H. and Whiteman W. B. 2009. *Bergey's Manual of Sys.*p22

Desmazeud Michel. 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherches laitières, INRA Jouy-en-Josas. France.

Dahou.A. 2017. Etude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industriel à pâte molle type camembert au cours de son affinage et évaluation de ses aptitudes technologiques, thèse doctorant, UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.p47.

FAO. 2012. Initiation des politiques en faveur des pauvres (PPLPI). Reumont P,(2009). Licencié Kinésithérapie, <http://www.medisport.be>. Consulté le 14/02/2016.

Fayolle L. 2015. Le lactose, indicateur de déficit énergétique chez la vache laitière

Gerrit S, Bart A.S. et Wim J.M.E. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS. Microbiol. Rev. 29 : 591-610.

Guiraud J.P., Rosec J.P ; 2004.Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. Saint-Denis la plaine, Paris. 300 p. uiraud J.P., 2003. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, dunod. Paris. 90-292.

Guiraud JP, 1998. "Microbiologie alimentaire". Technique et ingénierie, série Agroalimentaire. Paris, pp. 652. Guiraud JP, Galzy P (1980) L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions de l'usine nouvelle. Paris, pp. 239.

Guessas, B., Hadadji, M., Said,i N. And Kihal, M., 2006. Inhibition of staphylococcus aureus growth by lactic acid bacteria in milk. Dirasat, agricultural sci. 32: 3, 304-312.

.Guiraud, J.P., Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor.237-251.

Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod_RIA, Paris. 696 P.

Guessas, B. Adjoudji M and KIHAL., 2012. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Major Technological Traits. Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie Faculté Des Sciences, Université D'Es-Senia Oran 1524 El-Menaouer31000 Algeria Sciences Journal 17 4,480-488, ISSN 1818-4952

Hadef.S,2012;Evaluation des aptitudes technologique et probiotique des bactéries lactiques locales, Mémoire Master ,Université Kasdi Merbah-Ourgla .

Haddie J.M. 1986.Other streptococci. Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.

Harrigan, W.F., Mccance, M.E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London ISBN: 012326040X.

Hassaine O, 2013. Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactérie lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia, p. 57-102.

Hebbache, I., Sebkh, S., Ouchemoukh, S.E., (2013). Teneurs en antioxydants et activités antioxydantes de quelques variétés de confitures industrielles

Harrigan, W.F., Mccance, M.E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London ISBN: 012326040X. ce de la nature et de vie, 56p

Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A & Caubet, R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the New chua fermented meat product of Vietnam, Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology .

Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. et Huis. in't. Veld, J. H. J., 1998: Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41, 85-101.

Homrani M. 2020. Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines florales. Thèse de doctorat. Univ Abdelhamid ben badis Mostaganem. P253.

Homrani, M, Dalache, F, Bouzouina, M, Nemmiche, S, Homrani, AEK. 2019. Antibacterial Activities of Algerian raw Honeys and Isolated *Lactobacillus* against Gram- negative Bacteria. : Advances in bioresearch, 1(10). 31-39.

Hutt, P., Shchepetova, J., Loivukene, K., Kullisaar, T., Mikelsaar, M. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J. Appl.Microbiol ,2006 13-32.

Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* .In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ed. P.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt pp. 1208 1234. Baltimore: Williams & Wilkins.

Ketrouci L. 2021. Etude physico-chimique et microbiologique du lait de brebis collecté dans différentes régions d'Algérie, détermination de la flore lactique et des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques, Thèse de doctorat. UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Domaine : S.N.V Filière : Sciences Agronomiques Spécialité : Production et Biotechnologie Animales.p35.

Koning C., Jonkers D.2008. *The effect of a multi specie probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxicillin* , Amer. Jour. Ofgastro. p 178-189.

KONIG H. and FROHLICH J., 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

LARPENT J.P., 1997. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.

Lallali, H & Lallali, M, (2018). Etude des propriétés probiotiques de quelques souches du genre *Lactobacillus* isolées de lait et rumen de la chèvre. Mémoire de Master. Université de Jijel, faculté des scient .

LAFARGE V., OGIER J.C., GIRARD V., MALADEN V., LEVEAU J.Y., GRUSS A. and DELACROIX-BUCHET A., 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Applied and Environmental Microbiology.

Leveau, J.Y., Boiux, M., De roissart, H.B. 1991. La flore lactique dans : *technique d'analyse et decontrôle dans les industries agroalimentaires*. 2^{ed.}, Tec& Doc, Lavoisier. Paris, p 3.

Leveau, J.Y et Bouix, M. 1993. Microbiologie industrielle dans : *les microorganismes d'intérêt industriel*. Tec&doc, lavoisier. Paris , p85-87.

Leroy F. et De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15 : 67-78.

Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I. et Talon R., 2007. Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés.* 25(5)

LYNCH C.M., MC SWEENEY P.L.H., FOX P.F., COGAN T.M. and DRINAN F.D., 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora.

Mahaut M, Jeantet R et Brule G, (2000). Initiation à la technologie fromagère. Tec & doc la voiser. P194.

Maghnia.D,2011 ;Etude de potentiel technologie des bactérie lactique isolées des aliments ferments traditionnels Algériens ,Mémoire Master ,Université d'Oran-Es-Senia Facuclté des science Département de biologie .p37

Mayeux, J., Elliker, P. & Sandine, W. 1962. Selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association 1111 N DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874, 655-&.

Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Blackwell publishing, Singapore.

Monnet V., Latrille E., Beal C. ET Corrieu G. 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *bactéries lactiques de la génétique aux ferments* . Tec& doc, la voiser. Paris, p512-592

Montville T.J., Meyer M.E., Hsu A.H.M. And Huang G.T.C., 1987. High pressure liquid chromatography and wide bore capillary gas-liquid chromatography methods for quantification of acetoin and diacetyl from bacterial cultures. *Journal of mrcrobtologwal methods* 7: 1- 8.

McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening. *Lait*, 80: 293-324

Nousiainen J., Javanainen P., Setala J. et Wright A.V., 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560

NURYSHEV, M. Z., & STOYANOVA, L. G. (2016). New Probiotic Culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: Effective Opportunities and Prospects. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 8(4). doi:10.4172/1948-5948.1000299.

POT B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.

Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi, (2005). Bactéries lactiques In bactériologies al Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. et Loubière P., 2003. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023. *imentaire « compendium d'hygiène des aliments » Federighi L. Ecomomica,* pp : 219-242.

RPENT J.P. and LARPENT G.M., 1990. Mémento technique de microbiologie 2ème Ed. Technique et documentaire lavoisier, Paris

Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. et Loubière P., 2003. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016-8023.

Salminen, S., Playne, M. Et Lee, Y. 2003. Successful probiotic lactobacilli: human studies on probiotic efficacy. Shortt.C et O'Brien.J. *Handbook. Function. Dairy. Prod ,* 2003, p13-21

Salminen S., Gorbach S., Yuan- Kun L., Benno Y., (2004). Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional Aspects.* eds salimen S., von Wright A., Ouwerhand A.; New York Dekker M. pp: 515-530

Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. et Fanni J., 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26 : 645-652.

Sharpe, M.E. (1981). The genus *Lactobacillus*. In *The Procaryotes, Vol II.* ed. M.P. Stan, H. Stolp, H.G. Truper, J.A. Balonis and H.G. Schleger pp. 1614 1630. New York: Springer-Verlag

Tahlaiti, H. (2019). Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté, Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ben badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, p205.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage.* 1: 239-290.

Veullemard, J.C. 1986. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & doc, lavoisier. Paris. 3 :1-65.

Zhang G, Mills DA and Block DE, (2009). Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of Lactococci, Enterococci, and Streptococci. *Applied and environmental microbiology.* Vol: 75(4): 1080–1087.

Zhang H. et Cai Y. 2014. *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice.* Springer Dordrecht Heidelberg New York London P: 535.

Zarour, K., Vieco, N., Pérez-Ramos, A., Nácher-Vázquez, M., Mohedano, M. L. & López, P. 2017. Food Ingredients Synthesized by Lactic Acid Bacteria. Microbial Production of Food Ingredients and Additives. Elsevier,1589-124.

ZERGOUG Amina (Thèse de doctorat) : Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires Année universitaire 2017/2018.

Zourari A., accolas J.P. and desmazeaud M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. Lait

<https://www.produit-laitiers.com>