REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Faculté de technologie

Département de génie de procédés et environnement

UNIVERSITE YAHIA FARES MEDEA

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :
BOUDIAF El alia & KOUIDER AMAR Mohamed

En vue de l'obtention du diplôme de master en génie des procédés
Option : Bioprocédés pharmaceutique.

Thème

Production de molécules biologiques par fermentation lactique.

Soutenu le 25/05/2017 Devant le jury composé de :

Pr. ABOUSAOUD .M…….. …….Président
Dr. TASSIST. A …….Examinateur
Dr. ARBIA.W ……..…….Promotrice

Année universitaire 2016- 2017

DEDICACE

Je dédie ce travail,

A ma mère (ASSIA), exemple d'une femme battante et source d'affection de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.

A mon père (HAMID), source de respect, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté.

A mes frères BOUZAR, ADEL, DJAWED.

A toute la famille de KOUIDER AMAR et CHIKER.

Une spéciale dédicace à mes amis : ZAHROO, YACIN, SOUHIL.

A ma binôme BOUDIAF EL Alia et sa famille.

Ce travail est dédicacé aussi à toutes mes enseignantes et à tous mes enseignants d'hier et d'aujourd'hui, de l'école primaire à l'université. Avec ma sincère reconnaissance et un grand merci d'avoir nourri ma connaissance et exalté mon goût pour le savoir.

Pour agir intelligemment, l'intelligence seule ne suffit pas.
Fiodor Dostoïevski

MOHAMED.

DEDICACE

Je dédie ce travail à,

Ma très chère et douce mère, la lumière de mes jours, la source de mon effort, ma vie et mon bonheur qui était avec moi à chaque étape de ma vie que dieu te garde pour nous.

A mon père l'homme de ma vie merci pour votre amour que dieu te garde dans son vaste paradis que dieu ait pitié.

A mes frères et sœurs :

Demain ne sera pas comme hier, il sera nouveau et il dépendra de nous.
Notre avenir comme notre passé doit être solidaire. C'est la plus belle chose qui nous est donnée naturellement. Notre force résidera toujours dans notre sincère entente et notre esprit de fraternité.

Mohamed, Amine, Ayoub
Amina, Hadjer, Hanan, Ibtissem

A mes neveux Djawad, Khalil, et Omar et ma nièces Rahaf.

A tous mes amis :

Pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir,
Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés
Un très grand merci à tous et à toutes.

Hala, Radhia, Batoul, Meriem, Wissem, Soraya, Zineb.

A mon binôme KOUIDER AMAR Mohamed et sa famille.

Et a tout la promotion de bioprocédés pharmaceutiques 2016-2017.

EL Alia.

REMERCIMENTS

En premier lieu on remercie Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce travail.

Ce mémoire est le résultat de trois mois d'effort et de travail, qui n'aurait jamais était achevé sans l'aide et le support de beaucoup de personnes. Nous adressons nos sincères remerciements à :

Madame ARBIA .W pour son support pédagogique, son précieux aide dans la conduite des expériencesdepuis nos premiers pas dans la recherche, ainsi que son aide moral pendant toute la durée de ce travail.

Nous remercions également, Monsieur le Professeur ABOUSAOUD.M, et Madame le Docteur TASSIST.A, qui nous font l'honneur de juger notre travail de master en tant que spécialistes enBioprocédés et Biotechnologie.

A tous les enseignants et enseignates du département de Génie des Procédés et toute la famille *Universitaire de l'Université Yahia. Farés de Médéa.*

Nous tiens également à remercier l'ensemble des membres du Hall Technologie et plus particulièrement à M^{lle} FERGANI Radia et Meriem BENHAOUA.

Nos remerciements s'adressent également à tous les travailleurs en groupe SAÏDAL de Médéa et surtout laboratoire de microbiologie plus particulièrement M^{lle} Sarah.

Finalement, on remercie toutes les personnes ayant contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de nos reconnaissance, nos meilleurs remerciements et l'expression de nos profond respect.

Listes des figures

Numéro	Titre de la figure	page
	Chapitre 2	
Figure 1	-Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARN r, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium*	11
Figure 2	-Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par SAIDI (2007).	16
Figure 3	-Voies fermentaires de la dégradation du glucose.	19
	Chapitre 3	
Figure 4	-Bioréacteur type batch.	32
Figure 5	-Bioréacteur type Fed-batch.	33
Figure 6	-Un fermenteur type continu.	34
	Chapitre 4	
Figure 7	-Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots.	44
Figure 8	-Représentation schématique d'un halo d'inhibition.	45
Figure 9	-Représentation d'un bioréacteur discontinu.	48
	Chapitre 5	
Figure 10	-L'aspect macroscopique des différentes souches sur milieu MRS.	53
Figure 11	-Observations microscopiques des bactéries lactiques avec un grossissement X100.	54
Figure 12	-Résultats du test (a) catalase et l'oxydase (b) des souches isolées.	55
Figure 13	-Effet du pH sur la croissance des bactéries lactiques isolées.	56
Figure 14	-Effet de la température sur la croissance des bactéries lactiques isolées.	56
Figure 15	-Thermorésistante des bactéries lactiques isolées.	57
Figure 16	-Résultat du test mannitol.	57
Figure 17	-Résultat du test ODC et ADH pour la souche LB_3.	58
Figure 18	-Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche Durham.	59
Figure19	-Résultat du test de lait de Sherman.	59
Figure 20	-Interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes et leurs témoins négatifs.	63
Figure 21	-Représentation graphique de la production d'acide lactique selon le plan d'expérience.	67
Figure 22	-Effet de l'interaction entre la température et le temps d'incubation sur la production d'acide lactique.	68
Figure 23	-Effet de l'interaction entre le volume de Tween 80 et la température d'incubation.	69
Figure 24	-Effet de l'interaction de NH_4Cl et la température sur la production de l'acide lactique.	70
Figure 25	-Représentation graphique de production de peroxyde d'hydrogène selon le plan d'expérience.	71
Figure 26	-Effet de l'interaction de la température d'incubation et le NH_4Cl, sur la production du peroxyde d'hydrogène.	73
Figure 27	-Profiles de désirabilité pour l'optimisation de la productivité d'acide lactique et de H_2O_2.	74
Figure 28	-Evolution du pH au cours de la fermentation discontinue.	76
Figure 29	-Evolution de la biomasse au cours de la fermentation discontinue.	77
Figure 30	-Evolution de la concentration des sucres totaux et (a) la concentration d'acide lactique et (b) la concentration peroxyde d'hydrogène, en fonction du temps.	78
Figure 30	-Spectres infrarouge de (a) l'hydroxyde de calcium et (b) Lactate de calcium précipité.	79
Figure 31	-Application des bactéries lactiques dans l'extraction de la chitine.	80

Liste des tableaux

Numéro	Titre du tableau	page
	Chapitre 1	
Tableau 1	-Analytique et synoptique de 1 litre du lait cru.	4
Tableau 2	-Multiplication de la flore aérobie mésophile en fonction de la température et de la	5
Tableau 3	durée de conservation. -Flore originelle du lait cru.	6
Tableau 4	-Flore microbienne du lait.	8
	Chapitre 2	
Tableau 5	-Caractéristiques physicochimiques du genre *Enterococcus*.	24
Tableau 6	-Classification des groupes du genre *lactobacillus*.	13
Tableau 7	-Genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.	17
Tableau 8	-Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes.	18
	Chapitre 3	
Tableau 9	-Les applications les plus courantes de l'acide lactique et de ses sels.	26
Tableau 10	-Souches sélectionnées pour la production d'acide lactique et leurs performances.	30
Tableau 11	-Matières premières de faible coût utilisées pour la production d'acide lactique.	31
Tableau 12	-Performances des fermentations lactiques selon le mode de culture.	36
	Chapitre 4	
Tableau 13	-Bactéries pathogènes utilisées dans le test.	38
Tableau 14	-Les conditions utilisées pour l'isolement des bactéries lactiques.	38
Tableau 15	-La matrice expérimentale.	46
Tableau 16	-Les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience.	47
	Chapitre 5	
Tableau 17	-Les différentes souches et leur milieu d'isolement.	53
Tableau 18	-Récapitulation des résultats de l'examen macroscopique et microscopique et les tests de la catalase et de l'oxydase.	55
Tableau 19	-Récapitulation des résultats de l'identification.	61
Tableau 20	-Les quantités d'acide lactique produit par les souches isolées et cultivées sur le même milieu de culture.	62
Tableau 21	-Diamètre des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques à activité antimicrobienne.	64
Tableau 22	-Les concentrations de l'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, rendements et productivité obtenus.	66
Tableau 23	-Les effets des différents facteurs sur la concentration en acide lactique.	68
Tableau 24	- Effet des différents facteurs sur la production de peroxyde.	72
Tableau 25	- Les facteurs optimisés donnant les meilleurs rendements.	75
Tableau 26	- Les conditions de culture choisies.	75

Abréviations

BAL : Bactéries lactiques

HTST : Hight température short time

Lc : Lactococcus

P : Pediococcus

E .coli : Escherichia coli

ssp. : Sous-espèce

sp. : Espèce inconnue

ADH: arginine dihydrolase

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

TSA : Tryptone soja agar

IR : infrarouge

DO : densité optique

°C : Degré celsius.

Sommaire

Introduction 1

Chapitre 1 : Le Lait

1.Présentation générale 3
1.1. Définition 3
1.2. Composition du lait 3
1.2.1. L'eau.....3
1.2.2. Matière grasse.....3
1.2.3. Matière azotée.....3
1.2.4. Les glucides.....3
1.2.5. Matière minérale 4
2. Microflore du lait.....5
2.1. Ensemencement du lait 5
2.2. Développement des micro-organismes 5
2.2.1. Flore originale.....6
2.2.2. Flore d'altération 6
3. Les produits laitiers traditionnels 8
3.1. Rayeb.....9
3.2. Lben.....9

Chapitre 2 : Les bactéries lactiques

1. Les bactéries lactiques 10
1.1. Habitat et origine des bactéries lactiques 10
1.2. Classification des bactéries lactiques.....10
1.2.1.Classification des genres.....11
1.3. Identification des bactéries lactiques 16
1.3.1. Caractères morphologiques et structuraux.....16
1.3.2. Les caractères physiologiques et biochimiques 17
1.4. Utilisations industrielles des bactéries lactiques 18
1.5. Voies métaboliques 19
1.6. Notion probiotiques 20
1.7. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....21
1.7.1. Le pH et les acides organiques 21
1.7.2. Le peroxyde d'hydrogène 22

1.7.3. Le dioxyde de carbone 22
1.7.4. Le diacétyl 22
1.7.5. La reutérine 23
1.7.6. Les bactériocines 23

Chapitre 3 : L'acide lactique

1.Introduction 25
1.1. Propriétés physicochimiques de l'acide lactique 27
2. Production d'acide lactique 27
2.1. La voie chimique 27
2.2. La voie enzymatique 28
2.3. La voie fermentaire 28
2.3.1. Micro-organismes producteurs d'acide lactique 28
2.3.2. Milieux de culture 30
2.3.3. Procédés de fermentation 32

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

1.Matériel 37
1.1. Verrerie, appareils et produits chimiques 37
1.2. Matériel biologique 37
1.3. Les milieux utilisés 38
2. Les méthodes 38
2.2. Isolement et purification des souches 38
2.3. L'identification des souches 39
2.3.1. Examen macroscopique et microscopique 39
2.3.2. Test de la catalase 39
2.3.3. Test de l'oxydase 39
2.3.4. Testes physiologique 39
2.3.5. Tests biochimiques 40
2.4. Test technogique 43
2.4.1. La conservation des souches 43
2.4.2. Criblage des souches productrices d'acide lactique 43
2.4.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode directe 43
2.4.4. Les fermentations 45

4.4.4.1. Préparation du milieu de fermentation 47
4.4.4.2. Préparation de Préculture 47
4.4.4.3. Réalisation des fermentations 47
4.4.5. Etude cinétique de la fermentation lactique 47
4.4.5.1. Les équations des bilans 48
4.4.5.2. Test d'acidification 48
4.4.5.3. Croissance et Mortalité 49
4.4.5.4. Rendement 49
4.4.5.5. Productivité volumétrique 50
4.4.5.6. Productivité spécifique 50
5. Méthodes d'analyse 50
5.1. Détermination du pH 50
5.2. Estimation de la biomasse 50
5.3. Dosage des sucres par la méthode de Dubois 50
5.4. Dosage de l'acide lactique 51
5.5. Dosage de peroxyde d'hydrogène par le permanganate 51
5.7. Précipitation de l'acide lactique 52

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1.Isolement et purification des souches 53
2. L'identification des souches 53
2.1. Examen macroscopique et microscopique 53
2.2. Test de la catalase et de l'oxydase 54
2.3. Résultats des tests physiologiques 56
2.4. Résultats des tests biochimiques classiques : 57
2.5. Résultats des tests technologiques 62
2.5.1. Criblage des souches productrices d'acide lactique 62
2.5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode directe 62
2.5.3. Les fermentations 65
2.5.3.1. L'acide lactique 67
2.5.3.2. Le peroxyde d'hydrogène 71
2.5.4. Etude cinétique de la fermentation lactique 75
2.5.4.1. Le pouvoir d'acidification globale de la souche *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* 75
2.5.4.2. Evaluation de la biomasse 76
2.5.4.3. Evolution de production de l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène 77

5. Précipitation de lactate de calcium par hydroxyde de calcium 78
6. Application biotechnologique de la souche isolée 80
Conclusion 81
Références bibliographiques
Annexe

الملخص

الهدف من هذا العمل هو إنتاج الجزيئات الحيوية مثل حمض اللبن، وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسين من السلالات المعزولة محليا من حليب البقر. السلالات المعزولة والتي تم تحديدها هي : *Lb. acidophilus, Lb. fermentum, Lb. delbrueckii ssp lactis, Lb. casei ssp tolerans Lactococcus lactis ssp cremoris* أظهر اختبار إنتاج حمض اللبن أن *Lb.delbrueckii ssp* اللبنية هي السلالة الأكثر فعالية بانتاج (9.882غ / ل). ان استخدام التصميم التجريبي مكن إنتاج 20.02غ/ل من حامض اللبن مع إنتاجية حجمية 0.54 غ/ل/سا. وبينما كان التركيز المنتج من H_2O_2 0.332 مول/ل ، مع إنتاجية حجمية قدرت ب 0.3017 غ/ل/سا العوائد الإجمالية كانت 9.1٪ و 0.16٪ من حمض اللبن و بيروكسيد الهيدروجين على التوالي. أظهر البحث عن النشاط المضاد للميكروبات أن السلالات المعزولة لديها نشاط كابح متغير ضد بكتريا *P.aeruginosa E.coli*و*S.aureus*, . خلال إنتاج حامض اللبن، القدرة التأكسدية مع إنتاج بيروكسيد الهيدروجين و إمكانية قوية لإنتاج مبيد جرثومي. ، و دلك نظرا للقدرة التأكسدية متعلق بإنتاج بيروكسيد الهيدروجين وإمكانية قوية لإنتاج البكتيريوسين. دراسةالحركية مكنت من تحديد معدل النمو الأقصى (µmax) ما يعادل 0.005 h^{-1} ، ومعدل وفيات 0،0025 h^{-1}. التحمض الكلي في ظروف عملنا، كان 2.11 (وحدة درجة الحموضة) ،وسرعة تحمض هو 0.004 (وحدة الرقم الهيدروجيني / ساعة).

الكلمات المفتاحية :حليب البقر، عصير التمر، البكتريا اللبنية، حمض التخمر اللبني، بيروكسيد الهيدروجين. البكتريوسين، مضادات الميكروبات.

Résumé

L'objectif de ce travail est la production de biomolécules tel que l'acide lactique le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines par des souches isolées localement à partir du lait de vache. Les souches isolées et identifiées sont : *Lb. acidophilus, Lb. fermentum, Lb. delbrueckii* ssp *lactis, Lb. casei* ssp *tolerans* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris.* Le test de production d'acide lactique a montré que la souche *Lb.delbrueckii ssp lactis*e st la plus performante avec (9.882g/l). L'utilisation du plan d'expérience a permis la production de 20,02g/l d'acide lactique et 0.322mol/l d'H_2O_2 avec une productivité volumétrique de 0,54g/l.h et 0,3017g/l.h d'acide lactique et d'H_2O_2, respectivement.

Les rendements globaux sont 9,1% et 0.16% d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène, respectivement. La recherche d'activité antimicrobienne a montré que les souches isolées présente une activité inhibitrice variable contre *S. aureus, P.aeruginosa* et *E.coli* par une action acidifiante grâce à la production d'acide lactique, une action oxydatif grâce à la production du peroxyde d'hydrogène ainsi que la forte possibilité de production de bactériocines. L'étude cinétique a permis de déterminer le taux de croissance maximal (µmax)qui est égale à 0,005 h^{-1}, le taux de mortalité kd qui est de 0,0025h^{-1}, le pouvoir d'acidification globale, dans les conditions de notre travail, qui est de 2.11 (unité de pH) ainsi que la vitesse d'acidification qui est de 0.004 (Unité de pH/h).

Mots clés : lait de vache, jus de dattes, bactéries lactiques, fermentation lactique acide lactique, peroxyde d'hydrogène, bactériocines, antimicrobien.

Abstract

The objective of this work is the production of biomolecules such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins by strains isolated locally from cow's milk. The strains isolated and identified are: *Lb. acidophilus, Lb. fermentum, Lb. delbrueckii ssp lactis, Lb. casei ssp tolerans and Lactococcus lactis* ssp *cremoris.* The lactic acid production test showed that the strain *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* is the most effective with (9.882g / l). Using the experimental design, 20.02 g / l of lactic acid and 0.322 moles / l of H2O2 were produced with a volumetric productivity of 0.54 g / l.h and 0.3017 g / l.h of lactic acid And H2O2, respectively.

The overall yields were 9.1% and 0.16% lactic acid and hydrogen peroxide, respectively. The search for antimicrobial activity showed that the isolated strains exhibited a variable inhibitory activity against *S. aureus, P. aeruginosa* and *E. coli* by an acidifying action through the production of lactic acid, an oxidative action by the production of hydrogen peroxide as well as the high possibility of producing bacteriocins. The kinetic study made it possible to determine the maximum growth rate (µmax) which is equal to 0.005 h^{-1}, the kd mortality rate which is 0.0025 h^{-1}, the overall acidification power, under the conditions of our work, which is 2.11 (pH unit) as well as the acidification rate which is 0.004 (Unit pH / h).

Key words: cow's milk, date juice, lactic acid bacteria, lactic acid fermentation, hydrogen peroxide, bacteriocins, antimicrobial.

Introduction

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie. En effet, ils sont doués de plusieurs activités importantes et peuvent être considérés comme étant des agents performants de transformation et certaines espèces permettent l'obtention de produits alimentaires fermentés stables à partir de matières premières d'origine naturelle. Les microorganismes sont également des agents de dégradation et leurs propriétés métaboliques et cinétiques peuvent être exploitées pour permettre l'hydrolyse, l'oxydation, la nitrification, la dénitrification, l'élimination des sulfates et des phosphates ainsi que la méthanisation des effluents polluants.

De plus, les microorganismes sont de remarquables agents de production et on leur doit la production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques, les bactériocines, etc. Malgré ce côté très bénéfique des microorganismes, certains d'entre eux causent des problèmes majeurs pour l'humanité. Il s'agit de bactéries, de levures unicellulaires et de champignons filamenteux pathogènes pour l'homme. A ce propos, actuellement on assiste à un problème très épineux qui est la résistance de ces microorganismes pathogènes aux molécules antibactériennes et antifongiques communément utilisées. De plus, dans le domaine agro-alimentaire, les aliments que nous consommons sont en grande majorité d'origine biologique (végétale ou animale) et les modifications microbiologiques (par le développement de microorganismes altérants et pathogènes) qu'ils subissent, les rendent très vite inconsommables et voir impropres à la consommation. Pour combattre ces microorganismes pathogènes, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, pour des applications pharmaceutiques, agricoles (remplacement des pesticides chimiques par des molécules bioactives naturelles) et agro-alimentaires.

Vue la complexité de la structure chimique des molécules bioactives, le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives est le moyen naturel qui consiste à chercher ces molécules notamment à partir de microorganismes. Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le

peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (Rodgers, 2001 ; Vermeiren et al., 2004).

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003). La production d'acide lactique par des micro-organismes s'est très bien développée depuis plus d'une dizaine d'années et souvent ce sont des procédés qui utilisent des substrats relativement coûteux (glucose, lactose et extrait de levure). Actuellement, différentes matières premières peu coûteuses servent de sources de carbone pour la production d'acide lactique: c'est le cas des mélasses, du lactosérum, des hydrolysats d'amidon, du blé (et même du bois). En effet, le milieu de culture entre pour une part importante dans le coût de production de biomasse, de métabolites et donc d'acide lactique. Il est donc essentiel de trouver un bon équilibre entre les qualités nutritionnelles et technologiques des matières premières, leur prix et leur disponibilité sur le marché (Djidel, 2007).

C'est dans un projet de recherche portant sur la production de biomolécules par les bactéries lactiques s'inscrit notre travail. Ce mémoire se divise en deux parties : une partie théorique et une partie expérimentale.

La partie théorique se divise en trois chapitres : le chapitre 1 porte sur une représentation générale de la composition du lait et de la microflore de ce dernier. Le chapitre 2 présente les caractéristiques des bactéries lactiques et leurs biomolécules. Et dans le chapitre 3 on a présenté l'acide lactique, ses applications et ses modes de production.

La partie expérimentale, constituée de deux chapitres, dans le premier on présente tout le matériel et les méthodes utilisés, et dans le chapitre II on présente les résultats obtenus au cours de notre travail ainsi que sa discussion.

Chapitre 1
Le lait

1. Présentation générale

1.1. Définition

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité (Alais, 1984).

1.2. Composition du lait

Il y a autant de laits différents qu'il existe de mammifères au monde (Alais, 1984). Les principaux constituants du lait sont donc par ordre décroissant : de l'eau très majoritairement, des glucides représentés principalement par le lactose, des lipides essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras, des protéines : Caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles, des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire et des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines, oligo-éléments (Walstra, 1978; Blanc, 1982; Cartier et al , 1984 ; Brule, 1987; Adrian, 1987; Pougheon, 2001) (Tableau 1).

1.2.1. L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre. En elles, sont dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (Mathieu, 1998).

1.2.2. Matière grasse

La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g par litre (Luquet, 1985). La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (Boutonnier, 2008).

1.2.3. Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (Goursaud, 1985). Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire et une phase soluble. La phase micellaire représente la caséine totale (environ 80% des protéines du lait) du lait.

1.2.4. Les glucides

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l'α ou β glucose uni à du β galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses (Luquet, 1985).

1.2.5. Matière minérale

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C (Luquet, 1985).

Tableau 1 : Tableau analytique et synoptique de 1 litre du lait cru (Le berre, 1999).

Composition \ Espèce	Vache	Chèvr	Brebis	Références
Protéines (g)	32	34.1	57.2	(Alais et Blanc, 1975)
Caséines (g)	26	26	44.6	(Cayot et Lorient, 1998)
Glucide (g)	46	48	44	(Renner,1983; Maurer et Schaeren, 2007)
Lipides (g)	37	42	75	(Doreau et al, 1999; Bocquier et Caja, 2001)
Cholestérol (g)	14	11	11	(Le berre, 1999)
Vit A (g)	0.37	0.24	0.83	(Renner, 1989)
Vit B1 (g)	0.42	0.41	0.85	(Fil, 1981)
Vit B2 (g)	1.72	1.38	3.30	(Jensen, 1995)
Vit D (UI)	0.0008	0.001	0.002	(Berger, 1988)
Sodium (mg)	0.50	0.37	0.42	(Sawaya et al., 1984)
Potassium (mg)	1.50	1.55	1.50	(Luquet, 1985)
Glucide (g)	46	48	44	(Renner, 1983; Maurer et Schaeren, 2007)
Lipides (g)	37	42	75	(Doreau et a l, 1999; Bocquier et Caja, 2001)
Calcium (mg)	1.25	1.35	2.0	(Mahieu et al., 1977)
Magnésium (mg)	0.12	0.14	0.18	(Wehrmûller et Ryffel, 2007)
Phosphore (mg)	0.95	0.92	1.18	(Neville, 1995)
Fer (mg)	0.20-0.50	0.55	0.2-1.5	(Gueguen, 1995)
Cuivre (mg)	0.1 –0.4	0.4	0.3 –1.76	(Luquet, 1985)
Zinc (mg)	3 –6	3.20	1 –10	(Gueguen, 1995)
Manganèse (mg)	0.010 –0.030	0.06	0.08 - 0.36	(Gueguen, 1995)

2. Microflore du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) (Larpent, 1997).

Dans des conditions de propreté et d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des *lactobacilles* et des *streptocoques* lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (Hermier et al., 1992).

2.1. Ensemencement du lait

Le lait recueilli après la traite contient toujours des micro-organismes dont le nombre et les espèces auxquels ils appartiennent sont très variables.

La présence inévitable de ces germes est due à des contaminations d'origine intra-mammaire qu'il est nécessaire de limiter le plus possible en raison du rôle néfaste qu'elles peuvent avoir sur la conservation du lait et sur la qualité et le rendement des produits fabriqués. (Weber, 1985).

2.2. Développement des micro-organismes

Trois facteurs principaux conditionnent la croissance microbienne : le nombre initial de germes, la température et la durée de conservation.

Le tableau2, montre l'influence des facteurs précités sur la croissance des bactéries aérobies mésophiles (improprement appelées flore totale) a différentes températures. (David Lubin, 1995).

Tableau2. Multiplication de la flore aérobie mésophile en fonction de la température et de la durée de conservation (David Lubin, 1995).

Température De conservation (°C)	Nombre de bactéries par ml	Facteurs de multiplication			
		24 heurs	48 heurs	72 heurs	96 heurs
4.5	4 200	1	1.1	2	4.7
	137 000	2	3.9	5.5	6.2
10	4 200	3.3	30	136	9 400
	137 000	8.5	98	182	300
15.5	4 200	380	7 8600	77 800	229 000
	137 000	175	4 600	17 500	386 000
25	4 200	7 000	15 600	88 500	240 000
	137 000	4 900	11 200	21 000	23 300

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite. Les germes présentés dans le lait peuvent être classés dans les deux flores suivantes :

2.3.1. Flore originale

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002). Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait contient essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : *Microcoques*, *Streptocoques lactiques* et *lactobacilles* (Guiraud, 1998).

Tableau 3 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002).

Microorganismes	Pourcentage (%)
Micrococcussp.	30-90
Lactobacillus	10-30
Streptococcus ou *Lactococcus*	‹ 10
Gram négatif	‹ 10

2.3.2. Flore d'altération

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les *coliformes*, les psychrotrophes, les levures et moisissures (Dieng, 2001).

- **Flore thermorésistante selon (David Lubin, 1995)**

Un certain nombre de bactéries est capable de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé. On distingue:

La flore thermorésistante totale : définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63°C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation HTST (72°C pendant 15 secondes).

La flore moyennement thermorésistante : qui n'est pas détruite par chauffage à 75°C pendant 12 secondes.

La flore fortement thermorésistante : qui n'est pas détruite par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Elle comprend notamment les spores bactériennes, qui nécessitent des températures supérieures à 100°C.

Les composantes de cette flore sont: *Micrococcus*, *Microbactérium* et *Bacillus* dont l'espèce *Bacillus cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation.

Le genre *Bacillus* réalise en, outre, des activités enzymatiques lactiques pouvant être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation.

- **Les *coliformes***

D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétérofermentaire. Ils peuvent se retrouver dans tous les types de lait. Ce sont des germes qui vivent dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Leur présence est un signe de contamination lors de la traite et pendant les manipulations et transvasements multiples que subissent les produits avant la commercialisation (Ba Diao, 2000).

- **Les psychrotrophes**

Le terme « psychrotrophe » désigne des micro-organismes qui ont la faculté de se développer à une température inférieure à 7°C, indépendamment de leur température de croissance plus élevée (Lahelec et Colin, 1991). Parmi les micro-organismes qui composent ce groupe, nous pouvons citer les genres à :

- GRAM (-) : *Pseudomonas, Alcaligenes, Aeromonas, Serratia,* etc...

- GRAM (+) : *Micrococcus, Corynebactérium,* etc...

En général dans le lait, c'est le genre *Pseudomonas* qui domine. Il est fortement psychrotrophe et il se multiplie par 100 en 48 heures à +4°C (MONSALLIER, 1994).

Ces germes produisent des lipases et des protéases thermorésistantes ayant pour conséquence l'apparition de goûts très désagréables dans les produits laitiers: goût amer, rance, putride, etc ...

Listeria monocytogenes est capable de se multiplier à une température comprise entre 0°C et +10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe (Rosset, 2001).

- **Levures et moisissures**

Les levures et les moisissures sont des cellules eucaryotes. Regroupées sous le vocable de flore fongique, elles peuvent être retrouvées aussi bien dans le lait cru, le lait en poudre ainsi que dans tous les autres produits laitiers (Alais, 1984).

❖ **Les levures**

De forme arrondie ou ovale, volumineuses ou unicellulaires, les levures sont utiles en industrie laitière car elles peuvent servir comme agents d'aromatisation. Elles sont aérobies facultatives et se développent en surface formant les boutons de nature mycélienne (Rozier, 1990). Par contre, d'autres levures *Kluyveromyces lacfis, Kluveromyces fragilis, Saccharomyces fragilis, Saccharomyces lactis*. Peuvent avoir des effets néfastes dans les aliments. Les levures supportent des pH de 3 à 8 avec un optimum de 4,5 à 6,4. Ce qui explique leur présence dans le

lait cru comme dans le lait Caillé (Bouix et Leveau, 1988). Elles entraînent des altérations rendant le produit final indésirable: aspect trouble, odeurs ou goûts anonnaux, gonflement des produits ou de leur emballage.

❖ **Les moisissures**

Les moisissures sont en général plus complexes dans leur morphologie et dans leur mode de reproduction. Elles peuvent être utiles ou indésirables en industrie alimentaire Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées en utilisant le lactose; cette propriété leur confère une utilité incontestable en fromagerie. C'est ainsi que le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* sont utilisés dans la fabrication de divers types de fromages. Mais le développement excessif de certaines moisissures comme *Géotrichum* à la surface des fromages, les rend glaireuses et coulantes, ce qui les déprécie fortement. Certaines moisissures élaborent des mycotoxines thermostables et liposolubles donc difficiles à éliminer une fois formées. Dans ce contexte (Wiseman et Applebaum, 1983).

Tableau 4 : Flore microbienne du lait (Leyral et Vierling, 2001).

Flore Originelle		Flore de contamination	
Bactéries des Canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pend et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
Lactobacilles, Streptocoques Lactiques.	*Pseudomonas, Flavobacterium, Enterbactéries, Microcoques, Corynébactéries, Bacillus, Streptocoques faecalis, Clostridium*.	*Clostridium, Coliformes fécaux Salmonella, Yersinia, Campylobacter.*	*Staphylococcus aureus, Brucella, Listeria.*

3. Les produits laitiers traditionnels

C'est l'augmentation de la production du lait durant certaines saisons, et la difficulté de son préservation sous la forme fraiche a conduit au développement des technologies de production traditionnelles (Dharam et Narender, 2007). Ces produits sont partie intégrante d'héritage algérien, et ont une grande importance, culturelle, médicinale et économique, ils ont été développé sur une longue période avec les compétences culinaires des femmes. En plus de la conservation des solides du lait pour plus longtemps à température ambiante, la fabrication de produits laitiers traditionnels améliore la valeur alimentaire du lait. Les produits laitiers traditionnels algériens importants qui ont la signification commerciale sont : *Lben, Jben, Rayeb ,Dhan et Zebda* et autres.

3.3. *Rayeb*

Le *Rayeb* est un produit qui n'aura aucun traitement thermique préalable et laissé s'acidifier par fermentation spontanée jusqu'à l'obtention d'un caillé (Touati ,1990). Il peut être consommé comme boisson après une simple homogénéisation, ou additionné aux autres plats traditionnels (couscous, mesfouf). Il entre dans la fabrication du *Lben* (Aissaoui, 2004).

3.4. *Lben*

Le *Lben* est fabriqué à partir de lait de vache, brebis et de chèvre .le lait subit une acidification spontanée par sa flore original jusqu'à coagulation. Le caillé obtenu est introduit dans la *Chekoua* ou le *Zeer* ou il subit une forte agitation ou barattage. En Algérie, le *Lben* entre dans la fabrication de différents fromages traditionnels tels que *Bouhezza* et *Klila*. La composition physico-chimique du *Lben* varie en fonction de la nature du lait utilisé, de la condition de la coagulation, de l'intensité de l'écrémage et la quantité d'eau additionnée lors du mouillage (Aissaoui, 2004).

Chapitre 2
Les bactéries lactiques

1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début de XXe siècle, les bactéries lactiques (BAL) constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Les BAL rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production liées à un métabolisme exclusivement fermenté de quantité importante d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dit : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétéro lactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO_2… etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al. 2005).

Elles sont Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005).

1.1. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, des viandes, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001).

- **Cultures des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croitre (sucre, acides aminés acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hames et Hertels, 2006). Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharppes (MRS) (annexe6). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes source de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.

1.2. Classification des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques a été en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (Stiles et Holzafel, 1997). Les méthodes phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, les types d'acides gras cellulaires. Le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques

ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries, et la classification des (BAL) va être profondément modifiée. D'autre méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (Penaud, 2006).

1.2.1. Classification des genres

Les groupes des bactéries lactiques renferment un ensemble d'espèces hétérogènes dont la fonction commune est la production d'acide lactique. On trouve les *Bifidobacterium*, *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Vagococcus, Tetragenococcus et Carnobacterium*.

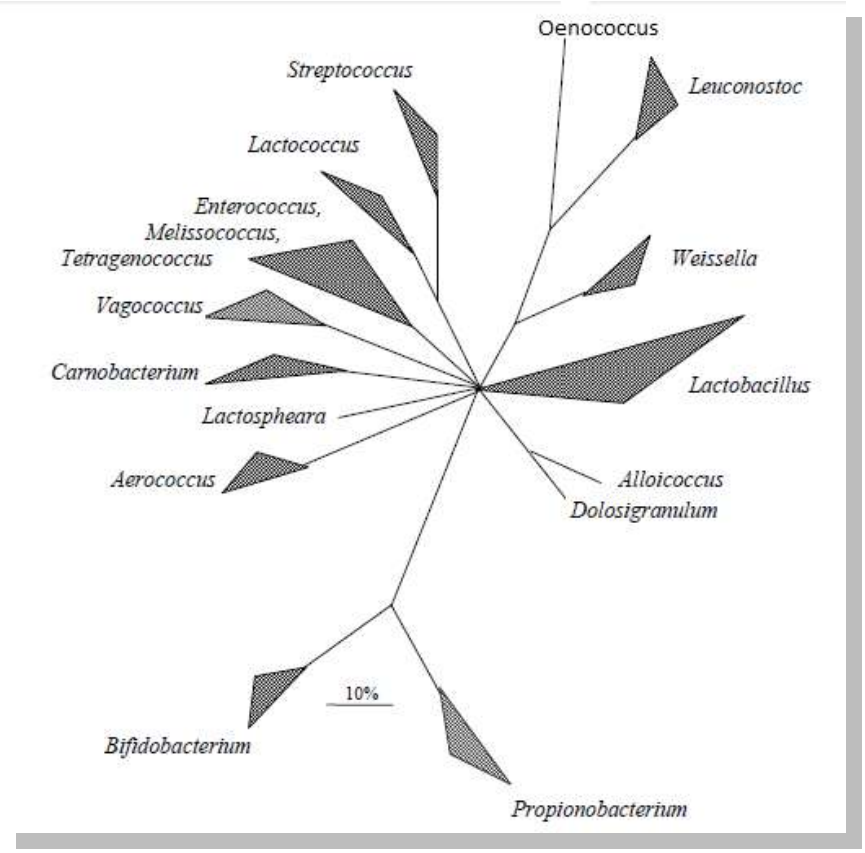


Figure 1 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARN r, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

1.2.1.1. Le genre *Bacillus Bifidus* ou *Bifidobacterium*

C'est le genre le plus connu et le mieux étudié dans l'ordre des Bifidobacteriales. Les *Bifidobacterium* se sont des bâtonnets, Gram positives, asporulées, immobiles, ont des formes variées (incurvées, rarement ramifiées) celles des formes bâtonnets peuvent généralement être isolées ou en amas et en paires ou en forme de V (Lansing et *al*., 2003).

Les *Bifidobacterium* sont anaéobies (Lansing et *al*., 2003), saccharlytiques (Scardovi , 1986), fermentent les glucides en donnent de l'acides acétique et l'acide lactique sans production de dioxydes de carbone (Lansing et *al*., 2003). Pas de production d'ammoniaque ou de H_2S (sulfures d'hydrogène) a partie des acides aminés et elles ne réduisent pas les nitrites nitrates.

Le métabolisme des hydrates de carbone par des bifidobacéries est différente de bactéries homofermentaires et hétérofermentaires. En effet, le fructose-6-phosphocétolase, une enzyme typique du genre Bifidobacterium, est responsable de la dégradation du glucose.

La détermination du glucose de cette enzyme est test crucial pour l'identification de ces micro-organismes (Shah, 2000).

1.2.1.2. Le genre *Enterococcus*

Les entérocoques sont des bactéries à gram positif qui se présentent sous forme de coques en courtes chaines (Hancock et Gilomore, 2000).

Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques du genre *Enterococcus* (Hancock et Gilmore, 2000).

Température de croissance	pH	NaCl	Tolérance à la bile	hydrolyse
10 et 45°C	9.6	6.5%	40%	Esculine

Elles se différencient des autres coccis à Gram positif par la composition de leur paroi, caractères morphologiques, leurs bagages enzymatiques, antigéniques et leur capacité de se développer dans des milieux extrêmes. Hors selon Giraffa, (2003) les *entérocoques* ont été considérés comme un indicateur de mauvaises conditions sanitaires lors de la production et la transformation du lait. Par contre d'autre chercheurs suggèrent que ce genre de bactérie peuvent avoir des bénéfices dans certains fromages, grâce à leurs activités protéolytiques et lipolytiques. En plus de la production des substances inhibitrices anti-*Listeria* (enterocins) (Ennahar et Deschamps, 2000).

Le genre *Enterococcus* de groupe sérologique D, présent dans le tube digestif de l'homme et des animaux et dont certaines espèces sont pathogènes opportunistes, le genre *Enterococcus*

n'était pas inclus dans la classification de Bergey, cependant quelques espèces de genre *Streptococcus*.

Schleifer & Kilpper-Bälz (1987) ont proposé de transférer certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre : *Enterococcus*. Il s'agit de *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium*, qui sont devenues ainsi *Enterococcus faecalis* (espèce type) et *Enterococcus feacium* (Leclerc *et al.*, 1996).

1.2.1.3. Le genre *Lactobacillus*

C'est le genre le plus étudié dans les bactéries lactiques. Comme indique leur noms les *lactobacilles* sont des bâtonnets ou des coccobacilles, asporulées, sont des bactéries anaérobies facultatives ou parfois microaérophiles, elles fermentent le sucre donnant de l'acide lactique comme seul produit de fermentation. Les *Lactobacillus* sont très exigeantes en matière nutritive (Mechai, 2009).

Les *Lactobacillus* se divisent en trois genres, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabaterium*, a été pour la première fois par Orla Jensen (1919). Cette classification tenait compte essentiellement de la répartition des voies de fermentation chez ces bactéries.

Actuellement, cette classification des sous genres a disparue de la dernière édition du Bergey's manuel (Kandler &Weiss, 1986). Cette même classification a été reprise, mais sous une forme numérotée. Ainsi, on distingue dans le tableau6 trois groupes de bactéries lactiques classées en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (Schleifer et Ludwig 1995; Axelsson, 1998).

- Les *Lactobacilles* homofermentaires strict (ancien sous-genre *: Thermobacterium*) ;
- Les *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) ;
- Les *Lactobacilles* hétérofermentaires strict (ancien sous-genre : *Betabacterium*).

Tableau 6 : Classification des groupes du genre *lactobacillus* (Axellson, 1998).

Caractères	Homofermentaires	Hétérofermentaires facultatifs	Hétérofermentaires obligataires
Fermentation des pentoses	-	+	+
Glucose (production de CO_2)	-	-	+
Gluconate (production de CO_2)	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphocétolase	-	+	+
Espèces	*Lb. acidphilus* *Lb. delbruekii* *Lb. helveticus* *Lb. salivarius*	*Lb. hasei* *Lb. curvatus* *Lb. plantarum* *Lb. sake*	*Lb. brevis* *Lb. bucheneri* *Lb. fermentum* *Lb. reuteri*

1.2.1.4. Le genre *Lactococcus*

De forme de coque, se présentent en chainette, thermosensibles, homofermentaires produisant que de l'acide lactique L(+) (Dellaglio et al., 1994). Elles se caractérisent par la production de diacétyle à partir du citrate (citrate+), certaines espèces utilisent l'arginine (ARG+) (Guiraud, 2003).

Le groupe des *lactoques* correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière. Cependant pour l'espèce *Lactococcus lactis subsp*. *Cremoris*, *Lactococcus lactis subp*. *Diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus subsp*. *Lactis* et Lactococcus lactis subp. *Cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson, 1998). La capacité des *lactocoques* à croitre à une température de 10°C et pas à 45°C est une caractérisé qui les distingue des autre *Enterococcus* des *Streptococcus* (Desmazeaud, 1992).

1.2.1.5. Les genres *Leuconostoc, Oenococcus* et *Weissella*

Appartient à la famille des *leuconostocaceae*, Gram positif, ont une forme coccis mais elles peuvent être allongés, associé en paire ou en chaines, non sporulées (Bergey *et* al., 2009), **c**atalase négatif, anaérobie facultatives, réalisent la fermentation hétérolactique en produisant à partir du glucose de l'acide lactique et éthanol ou en acide acétique par la voie de la transcétolase, elles tolèrent des concentrations élevées de sucre (Bergey et al., 2009).

Les *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques mésophiles (Savadogo *et al., 2011),* ils ont mentionné aussi que présence de *Leuconostoc* stimule également la croissance des *Lactococcus.*

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuconostoc paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuconoostoc oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuconostoc mesenteroides* (*especetye* de genre) ainsi que les autre espèces de genre *Leuconostoc* (Martinez- Muracia et collins, 1990).

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, catalase négative se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés et immobiles (Walter et al., 2001).

1.2.1.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Des bactéries lactiques, de forme de coque, catalase négatif, aérobie facultative. Fermentent le glucose en acide lactique sans production de gaz. Elles croissent dans un pH 5 (Bergey et al., 2009).

Les *pediocoques* sont formés de cellules groupées en paires en tétrades. Il s'agit de bactéries microaérophiles, leur métabolisme homofermentaires (Garvi, 1986 ; Decroissard,

1994 ; Hole et al., 1994). Les espèces se différencient par leur tolérances à la température, au pH et au NaCl et par leur spectre fermentaire, ils sont présentes dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre et vin. *P. pentasaceus* avec *P. acidilactici* sont bien représentées dans les végétaux et les produits laitiers (Simpson et Taguchi 1995).

Le genre *Tetragenococcus* regroupe des souches étroitement apparentées à l'espèce *Pediococcus halpholus*. Une seule espèce à été récemment reconnue, il s'agit de *Tetragenococcus halophilus* (Collins et al., 1990). La *Tetragenococcus* a besoin de sel pour sa croissance la raison que cette espèce avère très importante dans la fabrication des produits fermentés (Garvi, 1986).

1.2.1.7. Le genre *Streptococcus*

Sont des Gram positif, cocci non mobiles, appartenant à la famille des *Streptococcaceae*, anaérobies ou aérotolerantes sporulées, quelques espèces sont capsulées. *Streptococcus thermophilus* étant connue comme une espèce type, une bactérie alimentaire (Delorme *et al.*, 2010). Les *Streptococcus thermophilus* sont des bactéries lactiques à grande importance dans les industries laitières précisément dans la fabrication de yaourt et du fromage en collaboration avec d'autres espèces des bactéries lactiques : *Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Hols et al., 2005). Elles sont chimio-organotrophes à métabolisme fermentatif produisant de lactate mais sans gaz, catalase négative, et la température de leur croissance se situe entre 25-45ºC avec une température optimale de 37ºC (Bergey et al., 2009).

1.2.1.8. Le genre *Aerococcus*

Le genre *Aerococcus* a été proposé en 1953 pour classer des coques à Gram positif, des coques isolées ou en paires ou arrangées en amas, microaérophiles mais généralement anaérobies facultatives, catalase négative, asporulées (Ruoff, 2007). Son pH de croissance est 9, et peut tolérer des concentrations de 18% en Na Cl.

Se différenciant des Streptocoques par son mode de groupement. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale (Vela et al., 2007).

1.2.1.9. Le genre *Alloiococcus*

Des cellules ovoïdes, Gram positif, non-mobiles, asporulées, vivent en paire ou en tétrade. Se croissent en ralentis à une concentration en NaCl de 6,5% mais pas 10%. Et ne préfèrent pas la température de 10°C ni de 45°C. Sont aérobies, catalase -/+, oxydase négative, ne produisent de gaz, l'acide n'est pas produit à partir de la fermentation de glucose (Collins et al., 1987).

1.2.1.10. Le genre *Carnobacterium*

Des cellules en forme de courts bâtonnets non sporulé, isolés ou en paire, parfois en courtes chaînes, mobiles ou non mobiles constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés. Ces bactéries sont catalase, oxydase et nitrate réductase négatives. La température optimale de croissance des *Carnobacterium* varie de 23 à 30°C, elles peuvent se multiplier à des températures proches de 0°C et sont inhibées à partir de 45°C. Ce sont donc des bactéries psychotropes. Leur pH optimum de croissance varie selon les espèces de 6,0 à 7,4 (Collins et al., 1987).

Elles sont anaérobie aéro-tolérant. La plupart des espèces sont inhibées à partir de 7% de NaCl. En présence de sucre, leur métabolisme n'est que très faiblement hétérofermentaires, avec une large production d'acide lactique L(+). Contrairement aux *Lactobacillus*, les *Carnobacterium* sont peu acidifiants (Collins *et* al., 1987).

En 1991, le genre *Carnobacterium* s'est enrichi de deux espèces (*Cb. funditum* et *Cb. Alterfunditum*) (Franzmann et al., 1991). En 1991, Joborn et ses collaborateurs, ont proposé l'espèce *Cb. Inhibens* pour identifier une souche isolée du tube digestif d'un saumon de l'Atlantique (*Salmo Salar*), en se basant sur l'analyse de la séquence des ARNr 16S et des caractères phénotypiques. La nomenclature de *Cb. viridans* a été publiée pour trois souches isolées s'une sauce bolonaise emballée sous vide (Holley et al., 2002).

1.3. Identification des bactéries lactiques

1.3.1. Caractères morphologiques et structuraux

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactérien (coques ou bâtonnets) (Prevost, 2009) se trouve la figure 2

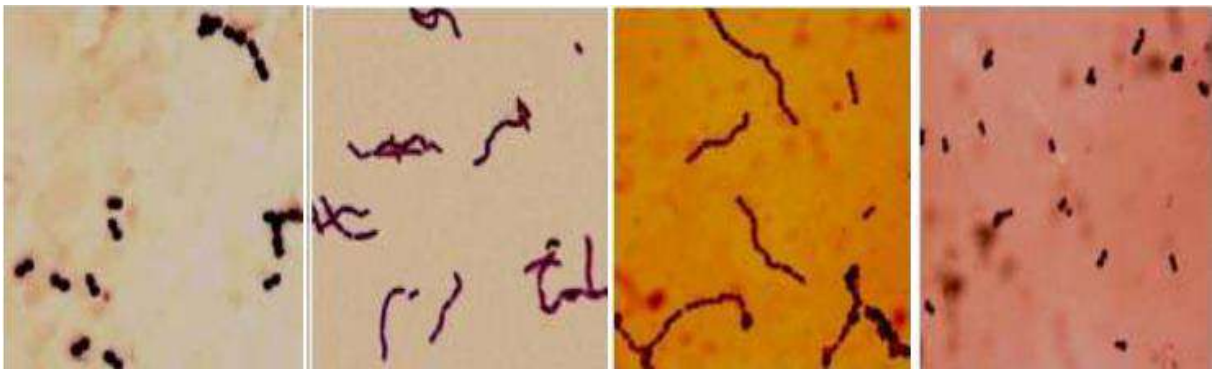


Figure2 : Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par SAIDI (2007). De gauche – droite Diplocoques (*Leuconostoc sp.*), (*Lactobacillus sp.*), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis sp.*)(Grossissement x 1000).

- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que longueur cellulaire.
- La mobilité : est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas ou elles possèdent des flagelles prétriches.
- La sporulation : toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- L'analyse de ces composes cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- Les recherches chimio taxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribue de façon fondamentales à expliques les relations génétiques intra et inter spécifiques.

La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict (Renouf, 2006).

1.3.2. Les caractères physiologiques et biochimiques

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arome, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes a leurs de pH (Luquet et de Roissard, 1994).

Tableau7 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Température optimale
Lactobacilles	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
Lactococcus	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
Streptococcus	Coques	homofermentaires	mésophiles ou thermophiles	19
Leuconostoc	Coques	hétérofermentaires	Mésophiles	11
Bifidobacterium	forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25

1.4. Utilisations industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut « Gras » (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées (tableau8). Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourt, laits fermentes, fromage, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes (O'Sullivan et al., 2002). Ces propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens. En effet, les bactéries lactiques ont la propriété de produire de nombreuses substances antimicrobiennes telles que les acides organiques (acide lactique), du peroxyde d'hydrogène, du CO_2, de l'acétyle, de l'acétaldéhyde et des bactériocines (Ray et Daeschel, 1994 ; Ring et Gatesoupe, 1998 ; O'Sullivan et al., 2002). Plusieurs revues et travaux de recherche rapportent le potentiel des bactéries lactiques utilisées comme culture ajoutées pour inhiber des microorganismes pathogènes présents dans les aliments (Wessels et Huss, 1996 ; Stile, 1996 ; Cintas et al., 2001 ; Rodgers, 2001 ; O'Sullivan et al., 2002 ; KatiKou et al., 2007), notamment l'inhibition de *L. monocytogenes* ,*E.coli, Candida Albicans, Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* en présence de bactéries lactiques (Nilsson et al, 1999 ; Richard et al., 2004 ; Vaz-Velho et al., 2005 ; Vescovon et al., 2006).

Tableau8 : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (d'âpres McKay et Badwin, 1990).

Application	Espèces utilisées
Fermentation des végétaux	*Ln. Mesenteroides, P.pentosaceus, Lb. Plantarum*
Fermentation de viandes et poissons	*Lb.plantarum, P.acidilactici*
Boissons alcoolisées	*Oenococcus oeni, Lb. delbruekii*
Café et cacao	*Bactéries lactiques variées*
Sauce de soja	*Lb. Delbruekii, P. soyae*

Aliment fermentées indigènes	*Bactéries lactiques variées*
Ensilage	*Lb. plantarum*
Probiotiques	*Lb. Acidophilus Lb. casei*
Pain de levain	*Lb.plantarum, Lb.brevis, Lb. Sanfranciscensis, Lb. fermentum*
Biscuits	*Lb. Plantarum, Lb. Brevis, Lb. Eichmannii, Lb. casei*
Produits laitiéres fermenté	*Lc. Lactis* subsp *lactis, Lc. Lactis* subsp *cremoris, LLc. Lactis* ;p *latis* biovar *diacetylactis, Ln. mesenteroides* subsp *cremoris, Ln. Lactis, St. thermophilus, Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. acidophilus.*

1.5. Voies métaboliques

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes (figure 3).

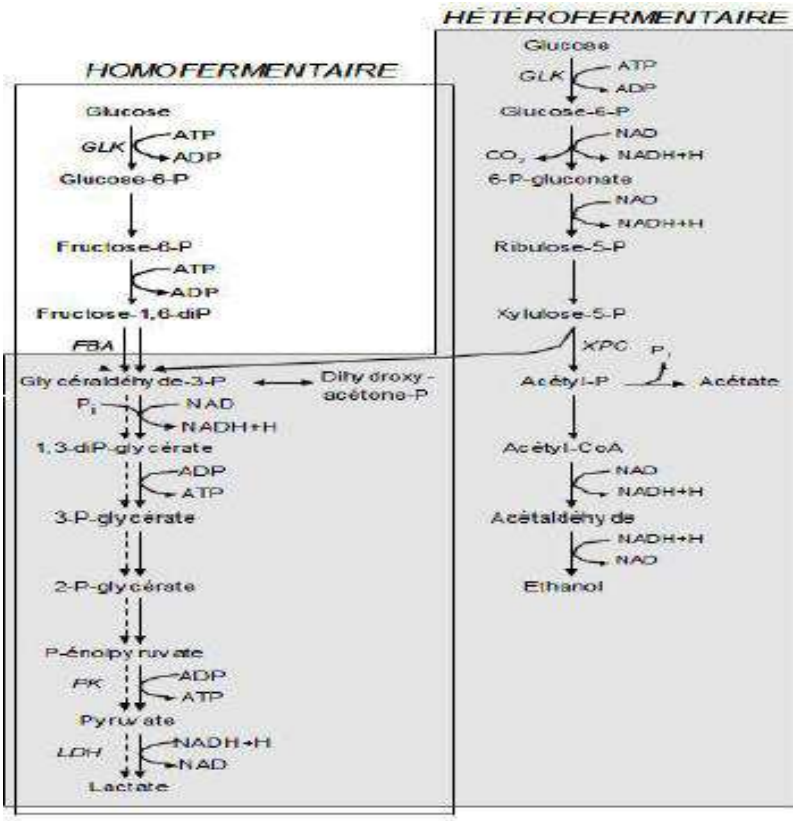


Figure3 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008) (GLK : glucokinase, FBA : fructoose-1,6-bisphosphate aldolase, XPC : xylulose-5phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate Kinase, LDH : lactate déshydrogénase).

- **Homofermentaires :** toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate.

Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique : C'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et /ou le CO_2 par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi et al., 2010).

- **Hétérofermentaires :** ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation.

Le pentose résultant est clivé en glycéraldhégyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyle phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO_2, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen et al., 2004).

1.6. Notion probiotiques

Le terme Probiotique dérive de deux mots grecs « pro » et « bios »et signifie littéralement « en faveur de la vie » (Roberrfroid, 2002). Un Probiotique est un microorganisme vivant qui est lorsqu'il ingéré en quantité suffisante il exerce un effet positif sur la santé (Dacosta ,2001). Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques (Givry, 1996). Parmi ces effets on peut citer :

- Les bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur le développement et la synthèse de toxines par autres microorganismes pathogènes (Karovicva et Kohajdova, 2003).
- Les bactéries lactiques possèdent des propriétés anti tumorales qui pourraient être due à :

1- L'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal.

2- La réduction des activités enzymatiques des bactéries intestinales telle que β-glucoronidase et l'azoréductase et la nitrroréductase (Chafai, 2006).

- La prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales (Lyons, 2000) ;

1- Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires : les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées (Chafai, 2006).Certaines souches de probiotiques notamment les Lactobacillus excrètent la β-galactosidase souvent déficiente dans tractus digestif

de l'hôte et facilitent la digestion du lactose, elles stimuleraient l'activité enzymatique des microorganismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. Elles stimuleraient également les activités lactase et invertase des cellules épithéliales du tractus digestif (Larent et Larpentgouraud, 1997).

- La diminution de la cholestérolémie par réduction de l'absorption intestinale du cholestérol endogène et exogène et la diminution de sa synthèse dans le foie (Dacosta, 2001).

1.7. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

1.7.1. Le pH et les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produit soit par la voie homofermentaires, soit par la voie hétérofermentaires. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (liu, 2003).

Grace à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe.

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments (Brul et al., 1999) et sont reconnus comme des additifs alimentaires.

Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (Hsiao et al., 1999). Le principal problème consécutif à leur utilisation est haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Kobilinsky et al., 2007).

La concentration inhibitrice minimale, qui est la plus petite quantité d'acide qui peut empêcher la croissance d'un microorganisme, de chacun de ces acides doit être déterminée dans des conditions précises de pH, mais aussi d'activité d'eau, de température… (Hsiao et al., 1999). Elle varie avec chaque microorganisme à inhiber.

Hsiao et al., (1999) ont montré qu'une concentration en acide acétique de 0.105 g/l inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* à un pH de 5.3 alors qu'il faut une concentration de 27.5g/l pour inhiber *Lactobacillus plantarum* et une concentration de 1.6 g/l pour inhiber *Escherichia coli* dans les mêmes conditions. *Listeria monocytogenes* est inhibé par de l'acide lactique à 9g/l et un

pH de 3.7 tandis qu'il l'est à un pH de 3.4 par l'acide chlorhydrique à la même concentration (Gravesen et al., 2004).

Les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés « acid tolerance response » vis-à-vis de l'exposition à des pH acides. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal. *L. monocytogenes* par exemple peut survivre à une exposition de 60 minutes à un pH de 3 (Bruk et Coote, 199. Cotter et al., 2003).

1.7.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005). Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamèrique ou tétramérique contenant du manganèse et qui est parfois décrit comme étant des pseudocatalases (Strus et al., 2006). La concentration de peroxyde d'hydrogène produite par des *Lactobacilli* varie entre 0.001 et 8 mM en fonction de l'espèces, de la souche et des conditions de cultures (Sakamoto et al., 1998 ; Strus et al., 2006). Son action se manifestera aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Zalan et al., 2005).

1.7.3. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et al., 2006).

1.7.4. Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus s.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* Et *Pediococcus sp.* Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactique, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al., 19988). Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm ; et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (27 ppm) (Caplice et al., 1999).

1.7.5. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropinaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (El-Ziney et al., 1998). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « Glycérol déshydratase » pour former de la reutérine qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydo-réductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. À haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweder, 2004).

1.7.6. Les bactériocines

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klanhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricides contre les espèces étroites liées à la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009 ; XIe et *al.*, 2011). Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif (Mami et *al.*, 2008 ; Gong et *al.*, 2010 ; Naghmuchi et *al.*, 2010). Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, les sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Galver et *al.*, 2007 ; Kall et *al.*, 2009 ; Tabasco et *al.*, 2009).

Les bactériocines se déférent par leur poids moléculaires, leur propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (BenOmar et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Ruiz-Barba et al., 2010).

Maintenant les bactériocines sont beaucoup utilisées dans ce secteur, considérées étant un moyen de préservation complémentaire (Deegan et al., 2006).

Elles ont été appliqué sous plusieurs états (purifiée, semi-purifiée ou sous la forme concentré). Aussi on peut utiliser les souches bactériennes productrices de cette substance et dans ce cas-là c'est la production des bactériocines *in situ* (Deegan et *al.*, 2006). D'après Guinane et al., (2005), on additionne les bactériocines purifiées ou semi purifiées dans un aliment comme des additif alimentaires. Seule la nisine est autorisée à l'utilisation comme additif alimentaire.

Sous la forme concentrée les bactériocines peuvent être appliquées après être récolté d'une souche productrice.

Les *Enterococcus faecalis* par exemple synthétisent une bactériocine (Ruiz-Mayano et *al.*, 2008) et elles ont été utilisées en tant que probiotiques.

Parmi les applications des bactériocines de bactéries lactiques, on peut citer l'utilisation de ferments producteurs de bactériocines dans l'industrie laitière (Cleveland et al., 2001).

La fixation des bactériocines sur des polymères pour l'emballage d'aliments pourrait aussi être un mode de conservation des aliments (Sebti et al., 2002).

Dans le secteur médical, La nisine est utilisée dans la prévention et le traitement d'ulcère causé par *Helicobacter pylori* (Blackburn et Projan, 1994) elle est aussi appliquée comme agent thérapeutique des mastites bovines et comme agent prophylactique.

La nisine est récemment utilisées en solution buccale dans le but de protéger les dents contre la plaque dentaires les inflammations gingivales chez le chien (Howell et *al.*, 1993). On peut donc fabriquer une pâte dentifrice à base de cette bactériocine ou un rince-bouche qui détruisent les bactéries associées à la mauvaise haleine.

Plusieurs essais cliniques sont en cours afin de rendre ces produits disponibles. Cependant, les bactériocines possèdent une courte vie chez l'humain (Tagg., 2004).

Chapitre 3
L’acide lactique

1. Introduction

L'acide 2-hydroxypropanoïque ou acide lactique est l'élément principal de tous les produits laitiers acidifiés auxquels il donne leurs caractéristiques fondamentales. C'est un produit naturel non toxique. Il fut identifié en 1847 par Blondeau comme produit de la fermentation bactérienne et mis en évidence pour la première fois dans le lait par Scheele en 1870. C'est en 1881 que sa production industrielle commence aux USA. En 1894, la production, essentiellement destinée aux industries du cuir et du textile atteint 5 tonnes/an (Vick, 1985). Chaque année, environ 50 000 à 80 000 tonnes d'acide lactique sont produites à travers le monde dont 90% sont réalisées à partir de fermentation microbienne. Les 10% restants sont produits synthétiquement à partir du lactonitrile (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000). Le prix d'un kg d'acide lactique peut aller de 1,40 US$ pour 50% de pureté à 1,90 US$ pour 88% de pureté (Akerberg et Zacchi, 2000).

C'est le secteur alimentaire qui est le plus gros consommateur de lactate (Tableau9). Ce dernier est employé comme conservateur pour les saumures, les produits laitiers, les viandes et le pain, mais aussi comme acidulant pour les bières, les vins et les sucreries (Garde et al., 2002).

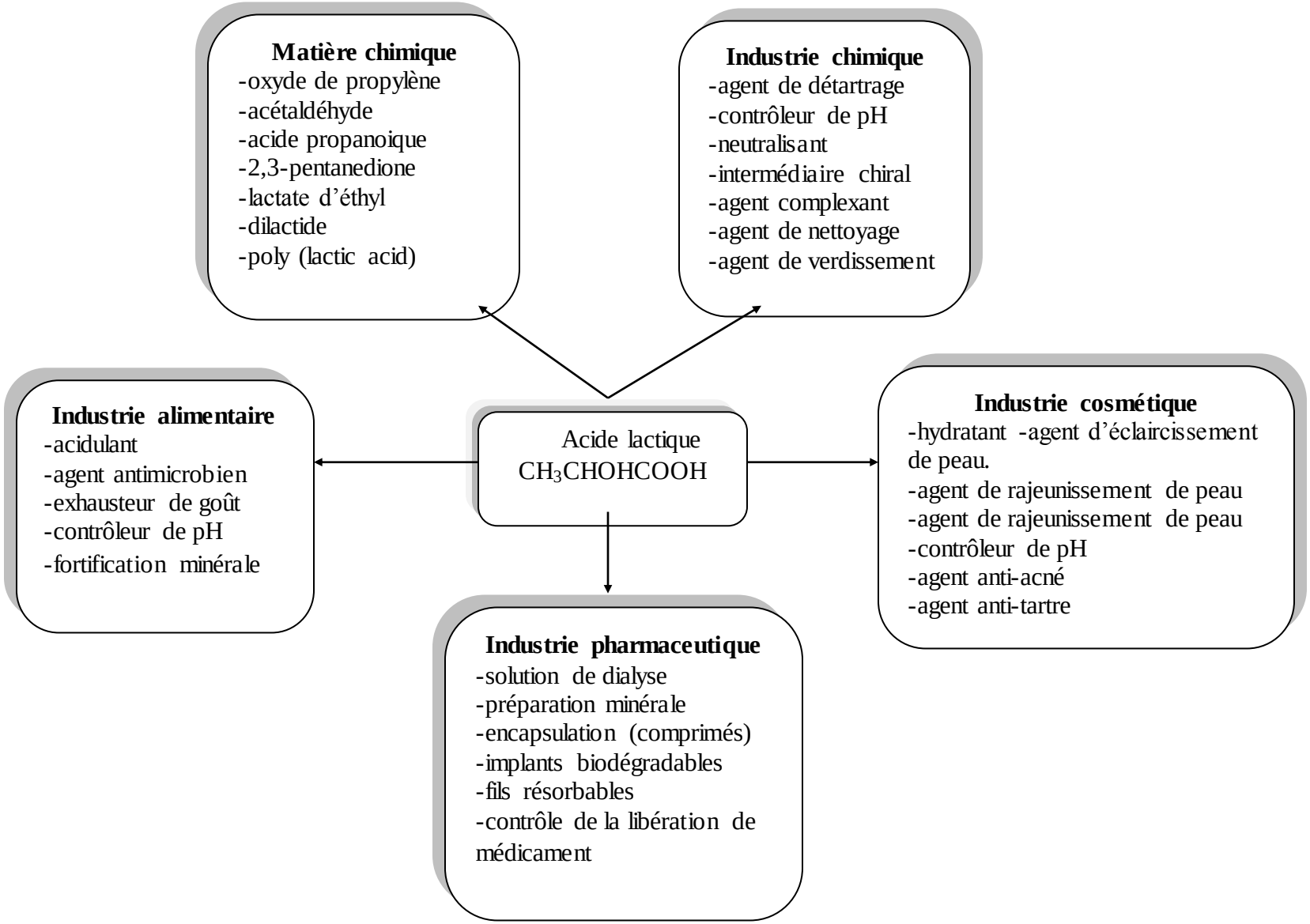
Le lactate de calcium est un bon stabilisant et épaississant. Le lactate ferreux est utilisé comme source de fer pour la supplémentation des laits maternisés. Enfin le lactate de potassium et d'ammonium sont connus pour être de très bons humectant, exhausteurs de goût et émulsifiants (Litchfield, 1996).

Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé sous sa forme ester optiquement active pour la synthèse de molécule chirale. Le lactate de sodium est utilisé comme solution de dialyse rénale et le lactate de calcium et celui de magnésium pour le traitement des déficiences en ces minéraux (Narayanan et al., 2004).

Au niveau cosmétique, l'acide lactique est utilisé dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux (Smith et al., 1977), dans les dentifrices comme agent détartrant et dans les lotions contre l'acné (Narayanan et al., 2004).

Les nouvelles applications de l'acide lactique sont essentiellement dues à sa forme polymérisée : PLA (Poly Lactic Acid) qui sont biocompatibles, biodégradables et bioassimilables (Bogaert, 1997; Lunt, 1998). Les applications sont multiples et concernent le secteur de la médecine (fils résorbables, implants biodégradables) (Lipinski et Sinclair, 1986); de l'alimentaire (O'marro, 1993); de l'agriculture (système de relargage pour engrais et pesticides) (Lipinski et Sinclair, 1986).

Tableau 09 : Les applications les plus courantes de l'acide lactique et de ses sels (Wee et al., 2006a).



L'acide lactique et les bactéries lactiques sont aussi utilisables dans l'extraction de la chitine par voie biologique. Les bactéries lactiques ont la capacité de produire l'acide lactique pour solubiliser les minéraux et d'excréter des protéases conduisant à la déminéralisation et à la déprotéinisation, respectivement. (ARBIA.L, 2010).

1.1. Propriétés physicochimiques de l'acide lactique

Les deux isomères optiquement actifs de l'acide lactique sont les formes L(+) et le D(-) (Narayanan et al., 2004).



Figure4 : Les deux isomères optiquement actifs de l'acide lactique (Narayanan et al., 2004).

L'acide lactique est soluble dans l'eau, incolore et très peu volatil. En solution à 20% ou plus, il peut se produire une auto-estérification due à la présence des groupements hydroxyle et carboxyle dans la molécule d'acide lactique. Le lactate forme un dimère cyclique appelé lactide ou des polymères linéaires de forme générale $H[OCH(CH_3)CO]_nOH$. Dans l'appréciation du rôle physiologique et de la physiologie de la nutrition de l'acide lactique dans l'organisme il est nécessaire de distinguer entre les formes L(+) et D(-) de cet acide. Il est couramment admis que la forme L(+) est plus rapidement métabolisée que la forme D(-) (Alma, 1982). Aussi il est souvent attribué à l'acide L(+) des qualités nutritionnelles supérieures.

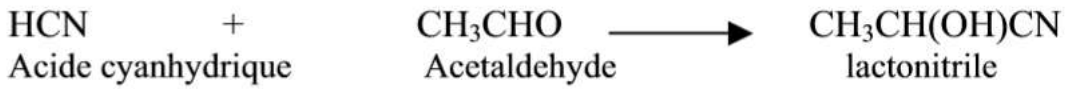
2. Production d'acide lactique

2.1. La voie chimique

La méthode principale de préparation synthétique est basée sur l'hydrolyse du lactonitrile par l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique (Narayanan et al., 2004) :



Le lactonitrile est obtenu par la réaction entre l'acétaldéhyde et l'acide cyanhydrique.



La production d'acide lactique par voie chimique présente l'intérêt d'utiliser des Co-produits de l'industrie chimique, mais surtout de produire de l'acide lactique thermostable d'une haute pureté et incolore.

2.2. La voie enzymatique

Deux types d'enzyme sont obtenues par fermentation de *Pseudomonas*: la L et la DL2-halo acide déhalogénase (Motosugi et al., 1982a et 1982b). Elles catalysent la déhalogénation de l'acide 2-halo-propionique comme l'acide 2-chloropropionique, avec inversion de la configuration C_2. (Motosugi et al., 1984; Liu et al., 1995 ; Nardi- Dei et al., 1997). Les réactions catalysées par ces enzymes sont les suivantes:

$$\mathbf{L\text{-}CH_3CHXCOOH + H_2O \longrightarrow D\text{-}CH_3CH(OH)COOH + HX}$$

L-2-halo acide déhalogénase

$$\mathbf{L(D)\text{-}CH_3CHXCOOH + H_2O \longrightarrow D(L)\text{-}CH_3CH(OH)COOH + HX}$$

DL- 2-halo acide déhalogénase

La L-2- halo acide déhalogénase agit sur l'isomère L de l'acide chloropropionique. Alors que la DL-2-halo acide déhalogénase catalyse la déhalogénation des deux énantiomères de l'acide chloropropionique.

2.3. La voie fermentaire

Ces dernières années montrent un tournant décisif dans la production d'acide lactique au niveau mondial. L'acide lactique est presque exclusivement produit par fermentation. Les micro-organismes généralement utilisés pour sa production sont variées, mais ce sont les *lactobacilles* qui sont les plus fréquemment utilisés. Ils peuvent croître à température élevée (40°C) et à faible pH (5 à 7) ce qui limite alors les contaminations. La mise en œuvre de ces micro-organismes en fermenteur est souvent en mode discontinu ou continu.

2.3.1. Micro-organismes producteurs d'acide lactique

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

- **Les bactéries lactiques**

Depuis la fin du dernier siècle, les progrès se sont considérablement accélérés, aussi bien dans la connaissance des micro-organismes responsables de la fermentation lactique que pour la mise au point de méthodes de sélection des souches sur des critères d'activité

et de résistance. La place importante des bactéries lactiques réside dans leur capacité à fermenter rapidement les sucres en acide lactique.

Les bactéries lactiques homofermentaires comprenant des espèces de *streptocoques*, *entérocoques*, *lactocoques* et *lactobacilles* convertissent presque quantitativement le glucose en acide lactique (90 à 95%). Le rôle principal des bactéries lactiques est la production par fermentation d'acide lactique et d'autres composés organiques à partir des sucres, produits qui influencent la texture, le goût et la qualité microbiologique des aliments (Singh et al., 2006; De Vos et Hugenholtz, 2004; Caplice et Fitzgerald, 1999). Les *lactobacilles* sont les micro-organismes les plus fréquemment utilisés pour la production d'acide lactique (Tableau10).

Les propriétés technologiques apportées par ces bactéries sont nombreuses et variées, parmi elles, l'activité acidifiante est un critère de sélection de première importance, mais à cause de leur faible aptitude à la biosynthèse, elles sont considérées comme un des groupes les plus exigeants au point de vu nutritionnel. Le groupe des *bacilles thermophiles* est très hétérogène. Peu de souches sont capables de produire de l'acide lactique en forte concentration. Mais leur caractère thermophile (elles ne se multiplient qu'à partir de 45°C et sont capables de se multiplier à 65°C) constitue un critère de sélection important au niveau industriel (peu de risque de contaminations). C'est le cas de *Bacillus coagulans* hétérofermentaire facultative et aérotolérante (Heriban et al., 1993; Payot, 1999). *Enterococcus feacalis* caractérisé par son aptitude à cultiver dans des conditions hostiles de croissance, thermorésistant, tolérant de larges variations de pH, constitue une souche attractive pour une utilisation industrielle (Wee et al., 2006b). D'autres utilisent les mutations génétiques pour augmenter la production d'acide lactique, c'est le cas de *Lactobacillus delbruekii* qui produit jusqu'à 117 g/l d'acide lactique contre 67 g/l pour la souche sauvage (Demirci et pometto, 1992).

- **Les champignons**

Un nombre limité d'autres micro-organismes est capable de produire de l'acide lactique. Parmi ces derniers, il existe quelques moisissures (Tableau10). L'utilisation de champignons, tel que *Rhizopus oryzae*, pour la production d'acide lactique présente un intérêt, car elle ne requiert pas de sources d'azotes organiques, utilise des glucides tels que les hexoses ou les pentoses et est facilement séparable du milieu de culture lors des procédés de purification de l'acide lactique (Miura et al., 2003; Magnuson et Lasure, 2004). Ces micro-organismes occupent une place importante sur le marché des enzymes. Il s'agit

presque exclusivement d'hydrolases dont les producteurs principaux appartiennent aux zygomycètes. Le genre *Rhizopus* comme *R. oryzae* et *R. arrhizus* possèdent des enzymes amylolytiques capables de transformer l'amidon en acide L(+) lactique (Yin et al., 1997; Oda et al., 2002).

Tableau10 : Souches sélectionnées pour la production d'acide lactique et leurs performances.

Micro-organisme	Lactate (g/l)	Productivité (g /l.h)	Références
Rhizopus oryzae	83,0	2,6	Zhou et al., 1999
Rhizopus oryzae	104,6	1,8	Park et al., 1998
Enterococcus faecalis	144,0	5,1	Yun et al., 2003
Lactobacillus rhamnosus	67,0	2,5	Berry et al., 1999
Lactobacillus helveticus	65,5	2,7	Schepers et al., 2002a
Lactobacillus bulgaricus	38,7	3,5	Burgos-Rubio et al., 2000
Lactobacillus casei	82,0	5,6	Hujanen et Linko,1996
Lactobacillus plantarum	41,0	1,0	Fu et Mathws, 1999
Lactobacillus pentosus	21,8	0,8	Bustos et al., 2004
Lactobacillus amylophilus	76,2	0,8	Vishnu et al., 2000
Lactobacillus delbrueckii	90,0	3,8	Kotzanmanidis et al., 2002
Lactococcus lactis ssp. Lactis	90,0	1,6	Roble et al., 2003
			Ohkouchi et Inoue, 2006

2.3.2. Milieux de culture

Au niveau industriel l'objectif premier est le développement de procédés performants et innovants en vue de la production d'acide lactique. Bien souvent pour que cela soit économique et rentable, de telles productions peuvent se faire à partir de matières premières brutes non raffinées. De nombreux procédés ont été expérimentés et la matière première y a été diversifiée. Les matières amylacées et cellulosiques présentent un grand intérêt économique. Ils sont abondants et sont moins onéreux (Ohkouchi et Inoue, 2006; Akerberg et Zacchi, 2000; Richter et Berthlod, 1998; Venkatesh, 1997).

Plusieurs substrats amylacés ont été utilisés. L'hydrolyse de l'amidon de ces substrats est facilitée par la production à l'échelle industrielle et de bon marché d'enzymes spécifiques telles que les amylases et les amyloglycosidases. Parmi ces substrats nous pouvons signaler le sorgho (Richter et Berthlod, 1998; Richter et Trager, 1994), Le blé

(Naveena et al., 2005; Akerbekg et Zacchi, 2000; Akerbeg et al., 1998), le maïs (Oh et al., 2005), la pomme de terre (Xiadong et al., 1997), le manioc (John et al., 2006; Xiadong et al., 1997; Roble et al., 2003), le riz (Oh et al., 2005; Yun et al., 2004), le seigle (Richter et Berthold, 1998), l'orge (Oh et al., 2005; Linko et Javainainem, 1996; Vishnu et al., 2002).

Tableau11 : Matières premières de faible coût utilisées pour la production d'acide lactique.

Matières premières	Micro-oganismes	Références
Hemicellulose	*Bacillus sp.*	Patel et *al.,* 2004
Mélasses	*Lactobacillus delbrukeii*	Kotzanmanidis et *al.,* 2002
	Enterococcus faecalis	Wee et *al.,* 2004b
Seigle	*Lactobacillus paracasei*	Richter et Berthold, 1998
Sorgho	*Lacobacillus paracasei*	Richter et Berthold, 1998
Blé	*Enterococcus faecalis*	Oh et *al.,* 2005
Maïs	*Enterococcus faecalis*	Oh et *al.,* 2005
Manioc	*Lactobacillus casei*	Rojan et *al.,* 2005
Pomme de terre	*Lactobacillus amylovorus*	Yunet *al.,* 2004
Riz	*Lactobacillus sp.*	Yunet *al.,* 2004
Orge	*Lactobacillus amylophilus*	Vishnu et *al.,* 2002
Cellulose	*Lactobacillus coryniformis ssp*	Yanez et *al.,* 2003
Corncob	*Rhizopus sp.*	Miura et *al.,* 2004
Déchet de papier	*Lactobacillus coryniformis ssp*	Yanez et *al.,* 2005
	torquens et *Rhizopus oryzae*	Parck et *al.,* 2004
Bois	*Lactobacillus delbrukeii*	Moldes et *al.,* 2001
	Enterococcus faecalis	Wee et *al.,* 2004a
Lactosérum	*Lactobacillus casei*	Büyükkilci et Harsa, 2004
	Lactobacillus helveticus	Schepers et *al.,* 2002

Les matières cellulosiques sont également intéressantes pour la production d'acide lactique. Venkatech (1997) ainsi que Yanez et al. (2003) ont utilisé un procédé de saccharification et de fermentation simultanée, en utilisant la cellulose pure. Parck et al. (2004), Yanez et al. (2005) ont utilisé les déchets de papier, Moldes et al. (2001); Wee et al. (2004a) ont utilisé le bois. Garde et al. (2002) ont utilisé l'hydrolysat d'hémicellulose.

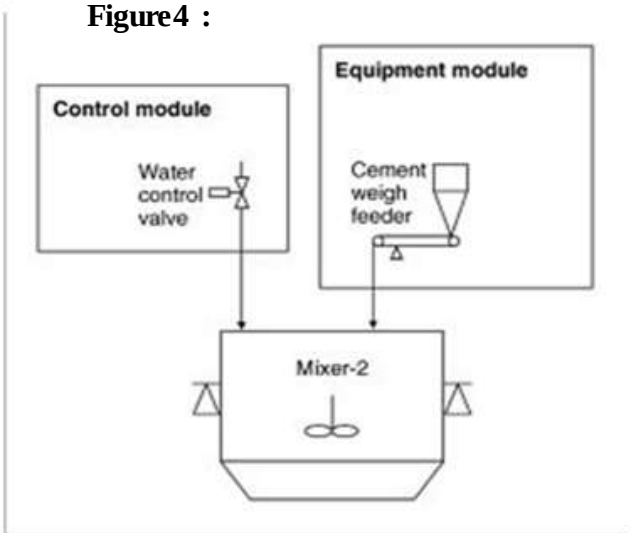
Sreenath et al. (2001) ont étudié la production d'acide lactique à partir des déchets agricoles comme la luzerne, la farine de son de blé et la poudre de paille. Les techniques les plus avancées visent à valoriser le lactosérum par biotransformation. Le lactosérum est un aliment intéressant non seulement par la présence du lactose, mais aussi par la teneur en protéines et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B et des sels minéraux. En effet pour une utilisation complète du lactose, il est indispensable de supplémenter le lactosérum en sources azotées. Amrane et Prigent (1998); Kulozik et Wilde (1999); Shepers et al. (2002) ont utilisé l'extrait de levure comme source azotée pour la production d'acide lactique. L'extrait de levure est la source d'azote la plus efficace, mais ce substrat est très onéreux. Et par souci de minimisation du coût de production d'acide lactique, on a assisté ces dernières années à la mise au point de procédés d'enrichissement protéique de matières premières. Différentes sources azotées sont utilisées en complément du substrat de fermentation: l'hydrolysat de protéines de lactosérum (Fitzpatrick et Keeffe, 2001), l'extrait de germe de malt (Pauli et Fitzpatrick, 2002), l'hydrolysat de cornes de bélier (Kurbanoglu et Kurbanoglu, 2003), la liqueur de «corn steep» ou extrait soluble de maïs (Wee et al., 2006b), l'extrait de soja (Ohara et Yahata, 1996) et les sels d'ammonium (Hujanen et Linko, 1996).

2.3.3. Procédés de fermentation

2.3.3.1. Réacteurs discontinus (batch)

Pour de nombreuses productions, les procédés mis en œuvre sont surtout de type batch. Ce mode de fermentation est très développé au niveau industriel. Ce dernier permet d'étudier les conditions de culture des souches d'une part, et d'autre part développer les performances de la fermentation lactique en testant différents substrats raffinés ou non. Les micro-organismes possèdent des capacités extrêmement variées d'adaptabilité à la température et au pH. Dans un milieu contenant tous les nutriments requis et dans un environnement physicochimique favorable, la souche montre une aptitude à la croissance et à la production plus importante. Payot et al., (1999) ont

Figure4 :



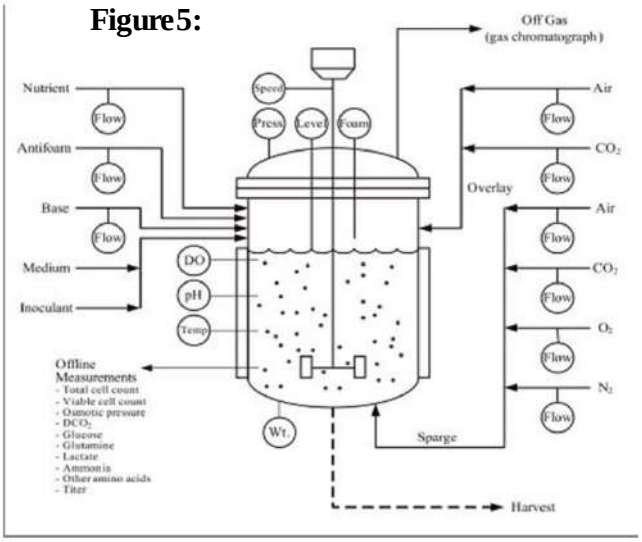
bioréacteur de type Batch (Barker et Rawtani, 2004)

montré que la production d'acide lactique par *Bacillus coagulans* dépend de la température, du pH mais aussi de la source d'azote. Pour une concentration de saccharose de 60 g/l, un pH de 6,4 et une température de 52°C, les concentrations de biomasse et d'acide lactique sont respectivement 3,5 et 55 g/l. Le pH influence la vitesse de catalyse des enzymes et donc la vitesse de croissance et de production (Yoo et al**.,** 1996; Kumar-Dutta et al., 1996; Amrane et Prigent, 1999; Guyot et al., 2000). Lors de cultures à pH libre, la diminution du pH se combine à l'accumulation de l'acide lactique et conduit à une forte inhibition de la croissance et du métabolisme bactérien dû à la forme non dissociée du lactate qui influence les rendements de conversion du substrat en biomasse et en produit (Gätje et Gottshalk, 1991; Norton et al., 1993; Goncalves et al., 1991). L'avantage du mode discontinu est principalement lié aux rendements obtenus en présence d'une source d'azote importante. Plusieurs études sur l'effet des sources azotées ont été réalisées et ont permis d'améliorer les performances de production d'acide lactique (Hujanen et Linko, 1996; Arasaratnam et al., 1996; Morabito, 1994; Oh et al., 2005).

2.3.3.2. Réacteurs semi continus (Fed-Batch)

Les cultures semi continues sont réalisées afin d'améliorer les performances du procédé de fermentation lactique. En effet ce mode de culture permet généralement d'obtenir des concentrations cellulaires élevées et, dans la mesure ou il est possible d'agir sur une ou des concentrations en substrat dans le milieu de culture, d'améliorer la productivité volumétrique du produit. Peu de travaux ont été réalisés en ce qui concerne la production d'acide lactique dans ces conditions. Notons que Roukas et Kotzekidou (1998) ont utilisé une culture mixte de cellules libres et co-immobilsées de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Dans les deux cas le procédé semi continu a permis d'améliorer les performances de fermentation. Pour le semi continu utilisant les cellules libres, la productivité volumétrique et la concentration finale d'acide lactique ont doublé (1,91 g/l.h, 46 g/l) par rapport au discontinu (0,93 g/l.h, 22,5 g/l). Bai et al. (2003) ont réalisée une

Figure5:



Bioréacteur de type Fed-Batch
(Jon Charles Gunther, 2007).

hyperproduction d'acide lactique en utilisant *Lactobacillus lactis*. Un maximum d'acide lactique de 210 g/l est obtenu avec une productivité de 2,2 g/l.h.

2.3.3.3. Réacteurs continus

La productivité des fermentations en mode discontinu n'est pas optimale d'un point de vu économique. En conséquence, de nombreuse recherches se sont concentrées sur le mode continu pour améliorer ce paramètre économique (Litchield, 1996; Hofvendahl et al., 2000). En effet la possibilité de faire varier et de contrôler la vitesse spécifique de croissance en changeant le régime d'addition du substrat limitant est un des avantages majeurs par rapport aux cultures discontinues. Ganzalez et al. (1996) ont montré que le taux de dilution n'influence pas les fractions de L(+) lactate et D(-) lactate produits par *Lactobacillus casei subsp. casei* et *Lactobacillus coriniformis subsp. torquens* respectivement. Liew et al. (2006) ont obtenu une concentration et une productivité maximum en acide lactique de 45 g/l et 15,74 g/l.h respectivement en utilisant *Lactobacillus rhamnosus*, ceci avec un taux de dilution de 0,35 h^{-1}. Il existe aussi des systèmes de culture continue à deux ou plusieurs réacteurs, ce qui permet une plus grande flexibilité pour l'optimisation. Le système multi-étagé permet de séparer la croissance cellulaire de la production (Mulligan et Safi., 1991; Amrane et Prigent, 1996). Le principe de ce système consiste à faire la croissance dans le premier réacteur, puis faire la production dans les autres réacteurs en alimentant par les cellules provenant du premier réacteur. Les productivités observées varient alors entre de 2 et 6 g/l.h.

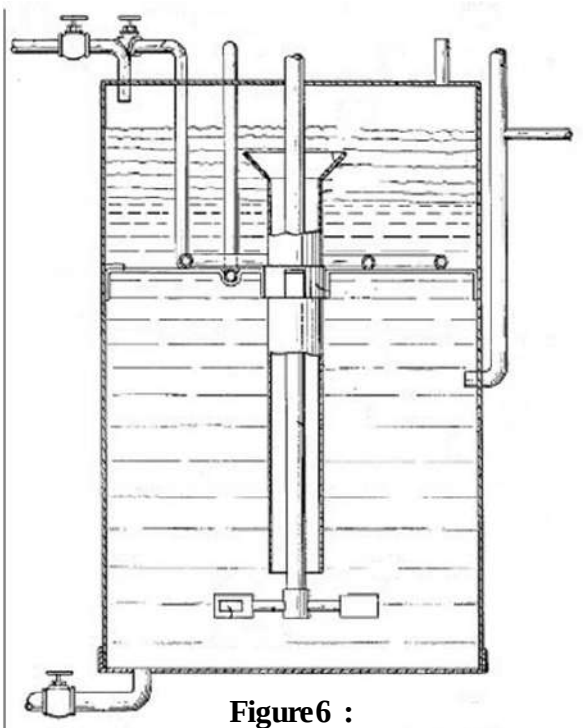


Figure6 :

Un fermenteur de type continu
(Ernest meyer, 1961).

2.3.3.3.1. Réacteur continu avec recyclage cellulaire

Une autre technique fait appel à des systèmes à haute densité cellulaire. Ces conditions de haute densité cellulaire sont obtenues grâce à la séparation de la biomasse cellulaire (et par là même également des métabolites) du milieu de fermentation. Les méthodes utilisées font intervenir la filtration sur membrane avec recyclage de la biomasse (Litchfield, 1996). Ces bioréacteurs à membranes sont très performants. Ils permettent en

effet d'augmenter la productivité. Mais ils ont tout de même un inconvénient majeur: la fragilité des membranes et le problème lié aux colmatages (Roychoudhury et al., 1995). Kim et al. (2006) ont utilisé *Lactobacillus sp*. dans un procédé batch en série avec recyclage cellulaire, et ont obtenu une productivité maximale de 6,4 g/l.h. Oh et al. (2003) ont obtenu une productivité de 6,2 g/l.h en utilisant *Enterococcus faecalis*, Wee et al. (2006b), quant à eux, ont atteint une productivité de 4 g/l.h avec la même souche. Know et al. (2001) ont obtenu une productivité de 57 g/l.h avec *Lactobacillus rhamnosus* (culture continue biétagé à recyclage). You et al. (1997) obtiennent 12 g/l.h avec *Lactobacillus casei subsp. casei*.

2.3.3.3.2. Réacteur continu avec cellules immobilisées

L'immobilisation ou plus exactement la rétention en phase insoluble de cellules, possède des avantages potentiels. Le premier d'entre eux est l'obtention de hautes densités cellulaires. Bergmaier et al. (2003) ont rapporté de fortes concentrations de cellules de *Lactobacillus rhamnosus* immobilisées dans un support de caoutchouc de silicone poreux (8.5. 10^{11} UFC/ml de support) pour la production d'exopolysaccharide. Les utilisations potentielles des bactéries lactiques immobilisées se sont multipliées. De nombreuses investigations ont été menées sur cette technique avec l'utilisation de différents supports. Les plus utilisés sont: l'alginate de calcium (Goksunger et guvenç, 1999; Guoqiang et al., 1991; Roukas et kotzekidou, 1996) et l'alginate de sodium (Yan et al., 2001; Klinkerberg et al., 2001). Senthuran et al. (1999) ont étudié l'encapsulation des cellules de *Lactobacillus casei* par polymérisation du polyéthylenimine. Ce système est couplé à un recyclage cellulaire. L'avantage principal de ce procédé découle de la relativement faible taille des capsules et dans la faible épaisseur des membranes qui permettent de favoriser les transferts de matière. Cotton et al. (2001) ont testé un système avec biofilm. Ils utilisent des supports en plastic composés principalement de polypropylène. Vick Roy et al. (1982) ont utilisé un bioréacteur à fibres creuses pour immobiliser *Lactobacillus delbrukeii*, Roukas et Kotzekidou, (1991) ont co-immobilisé *Lactobacillus casei* et *lactococcus lactis* dans du polylacrylamide. Buyukgungor (1992) a immobilisé *Lactobacillus bulgaricus* dans du carraghénane. Tuli et al. (1985) ont utilisé des billes d'agar. Krischke et al. (1991) ont utilisé des billes de verre pour immobiliser *Lactobacillus casei subsp. casei*. Cependant, certains problèmes se posent dans l'utilisation de cellules immobilisées, un des facteurs limitant essentiels étant la limitation diffusionnelle des substrats vers les cellules. Donc le choix du procédé est dicté par le type de cellules, le type de produits formés, et la stabilité du système et bien évidemment des considérations économiques.

Tableau 12 : Performances des fermentations lactiques selon le mode de culture.

Mode de culture	Micro-organisme	Source carbonée	Lactate (g/l)	Productivité (g/l.h)	Références
Discontinu	*Lactobacillus rhamnosus*	Glucose	125	2.2	Kwon et *al*., 2000
	Enterococcus faecalis	Lactose	95,7	4.0	Oh et *al*., 2003
	Bacillus coagulans	Saccharose	57	1.2	Payot,1998
	Lactobacillus casei	Lactose	103	2.2	Büyükkilleci et Harsa, 2004
Dicontinu à cellules immobilisées	*Lactobacillus casei*	Lactose	125.6	3.45	Göksungur et al., 2005
Semi-continu	*Lactobacillus casei*	Lactose	47	2	Roukas et Kotzekidou, 1998
	Lactobacillus lactis	Glucose	210	2.2	Bai et al., 2003
Continu	*Lactobacillus rhamnosus*	Glucose	45	15.7	Liew et al., 2006
	Lactobacillus delbrukeii	Glucose	25	9	Major et Bull, 1985
Continu bi-étagé	*Lactobacillus bulgaricus*	Lactose	38	5.7	Amrane et Prigent, 1996
Continu à cellules immobilisées	*Lactobacillus spp.*	Lactose	33	6	Zayed et winter, 1995
	Lactobacillus casei	Glucose	27	1.6	Guoqiang et al., 1991
	Lactobacillus casei ssp. rhamnosus	Glucose	22.4	9	Cotton et al., 2001
Continu avec recyclage cellulaire	*Lactococcus lactis*	Glucose	30.1	33.1	Nolasco-Hipolito et al., 2002
	Lactobacillus casei ssp. rhamnosus	Glucose	52	12	Yoo et al., 1997
	Lactobacillus rhamnosus	Glucose	92	57	Know et al., 2001

Chapitre 4
Matériel et méthodes

L'objectif principal de ce travail est de produire des biomolécules (acide lactique, peroxyde d'hydrogène et bactériocine) par un procédé de fermentation en culture discontinue (Batch) en utilisant une bactérie lactique cultivée sur le jus de datte.

Pour cela, on a :

- Isolé des bactéries lactiques à partir du lait et l'ben du vache ;
- Criblé la souche qui donne la meilleure productivité d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène;
- Réalisé un ensemble d'expérience en utilisant la stratégie des plans d'expérience en choisissant le plan composé central ;
- Fait une étude cinétique dans les conditions de l'expérience qui a donné les meilleurs productivités ;
- Déterminé les conditions optimales de la production d'acide lactique et de jus de dattes ;
- Criblé les souches bactériocénogenèses.

1. Matériel

1.1. Verrerie, appareils et produits chimiques

La verrerie, les appareils ainsi que les produits chimiques utilisés dans notre travail sont présentés dans le tableau (annexe1).

1.2. Matériel biologique

- **Lait et l'ben de vache**

Les échantillons de lait cru de vache est prélevé auprès des éleveurs et cela dans une ferme situé à Médéa ainsi que du l'ben préparé traditionnellement de la même région.

Les mamelles sont lavées avec l'eau savonneuse puis rinçage à l'eau javellisée et en fin un rinçage à l'eau distillé pour éliminé les traces d'eau javellisée. Les échantillons du lait et l'ben préparé traditionnellement sont recueillis dans des bouteilles propres et transportés au laboratoire.

- **Les souches microbiennes pathogènes**

Dans le but de cribler les bactéries lactiques bactériocénogenèses, quatre souches pathogènes de référence ont été utilisées (tableau13).

Tableau13: Bactéries pathogènes utilisées dans le test.

Souche pathogène	Gram	Code	Milieu d'incubation
E.coli	-	ATCC 29989	GN
Pseudomonas aeruginosa	-	ATCC 27623	GN
Staphylococcus aureus	+	ATCC 29991	GN

- **Les dattes**

Dans notre travail, nous avons choisi la datte cuite pour : sa disponibilité et sa faible valeur marchande. La datte cuite communément appelé « el ghars » de fabrication algérienne, cette patte de datte a la même caractéristique que les autres variétés.

1.3. Les milieux utilisés

* Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des souches et la préparation des précultures lors de la réalisation de cette étude est le milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960).

*** Le jus de datte** (annexe2) a été utilisé pour le criblage de la souche qui présente le meilleur rendement de production d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène, ainsi que toutes les expériences réalisées au cours de ce travail.

2. Les méthodes

2.2. Isolement et purification des souches

Les souches utilisées dans ce travail ont été isolées à partir du lait et de l'ben de vache élevée dans la région de Médéa (Berrouaghia). L'isolement est effectué sur milieu MRS pour toutes les souches. Après incubation dans les sacs d'anaérob1iose à 37°C pendant 24h, on repiqué une colonie de chaque souches trois fois successives afin d'assurer leurs puretés.

Tableau14 : Les conditions utilisées pour l'isolement des bactéries lactiques.

Milieu	Les bactéries	La température et la durée	Incubation
MRS	LB_1 LB_2 LB_3 LB_4 LB_5	37°C 24 à 48 h	Etuve

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (Guiraud, 2004).Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

2.3. L'identification des souches

Nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucre.

2.3.1. Examen macroscopique et microscopique

Un examen macroscopique est effectué en décrivant la couleur, l'aspect et la forme des colonies. La coloration de Gram (annexe5) nous permet de déterminer le type de Gram ainsi que la forme et le mode de regroupement.

Un examen microscopique à l'état frais était également réalisé pour vérifier la mobilité et la forme, une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope.

2.3.2. Test de la catalase

L'appartenance des souches au groupe lactique est aussi vérifiée par le test de l'activité catalasique. Il consiste en le dépôt d'une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur une colonie, l'effervescence de la suspension indique que la bactérie est catalase positive (cat^+). Elle décompose le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + 1/2O_2$$

Le contraire est négatif (Larpent et al., 1990).

2.3.3. Test de l'oxydase

Technique de recherche à partir d'une suspension bactérienne : dans 10 gouttes d'une suspension épaisse de bactéries en eau physiologique, on ajoute soit quelques gouttes de réactif, soit un disque. La coloration rose appariés en environ 1 minute (Marchal et al., 1991).

2.3.4. Testes physiologique

- Croissance à différentes températures (4, 15, 37 et 45°C)

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles, ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 4, 15, 37 et 45°C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Hassaine, 2013).

- Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Ce test consiste en l'ensemencement des isolats dans des tubes de bouillon de MRS à 2 %, 4% et 6.5% de NaCl. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures (Hassaine, 2013). La

croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

- **Croissance à pH 4 et 9,6**

Ce test est réalisé en milieux MRS liquide dont le pH est ajusté à 4 et 9, 6. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 37C° (Hassaine, 2013).

- **Thermorésistante**

Le but de cette opération était de faciliter la caractérisation des souches lactiques thermorésistantes dans le but de savoir qu'elles appartiennent aux bactéries probiotiques ou aux *entérocoques* sans oublier les *lactocoques*, on ensemence une colonie sur le milieu MRS liquide, ensuite il va subir à un chauffage (62°C/30min) et mettre à l'étuve 30°C/24h (Teuber et Geis, 2006). Un résultat positif se distingue par un trouble.

2.3.5. Tests biochimiques

- **Urée-Indole**

Une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml de milieu Urée- Indole, l'incubation se fait à 32°C±2°C pendant 24 à 48 h. Un virage de milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive.

- **Réaction de Voges-Proskauer (test VP)**

La fermentation du glucose par la voie du 2, 3-butanediolse traduit par une faible acidification du milieu ainsi que par la formation d'acétoïne. En présence d'un réactif VP, l'acétoïne forme un composé rose : réaction de Vosges-Proskauer (VP). Ensemencer avec 2-3 gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu liquide. Une teinte rouge cerise indique une réaction VP positive.

- **Test rouge de méthyl (RM)**

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes. La fermentation du glucose produit de l'acide pyruvique, puis des acides organiques. Ces acides font virer le RM au rouge et dans le cas contraire, il vire au jaune. Incubation 24 heures à 37°C, bouchon dévissé. Une teinte rouge indique une réaction RM positive (Marchal et al., 1999).

- **Mannitol-mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 32°C±2°C pendant 18 à 24 h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal et al., 1991).

- **TSI (Triple Sugar Iron)**

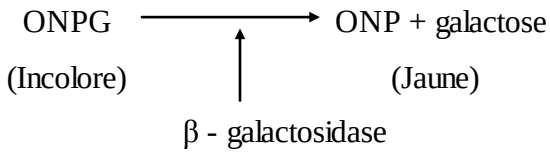
C'est un milieu au niveau duquel on recherche en 24h : l'utilisation du glucose et du lactose et le saccharose, la production de l'H_2S. Il renferme du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux. L'indicateur de pH est le rouge de phénol. La pente du milieu TSI est ensemencée par stries et le culot par piqure centrale, puis incubation à 37C° pendant 24 heures.

Ce milieu de culture, proposé par Hajna, (1945), est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H_2S) et de gaz. Le noircissement du culot indique la présence de H_2S.

- **Test ONPG: OrthoNitroPhényl – β-D – Galactopyranoside**

Le test ONPG ou test de l'ONPG – Hydrolase est un test complémentaire celui-ci permet, lorsque la bactérie est Lactose (–) de trouver s'il y a présence d'une β-galactosidase que l'on reconnait grâce à la coloration en jaune du milieu. Pour que la bactérie hydrolyse le lactose, il faut qu'elle ait deux enzymes : La β -galactoside perméase membranaire qui permet la pénétration du lactose dans la cellule et la β -galactosidase qui est une hydrolase capable d'hydrolyser la liaison osidique en donnant le galactose et le glucose.

L'hydrolyse de l'ONPG par une β–galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP) de couleur jaune selon cette équation :



* Les bactéries Lactose (+) possèdent la B-galactosidase donc elles sont toujours ONPG +,

* Par contre les bactéries lactose (–) peuvent être :

o ONPG (-) : elles ne possèdent pas d'ONPG-hydrolase (β -galactosidase).

o ONPG (+) : elles possèdent soit une B-galactosidase, mais pas de β-galactosidase perméase et elles ne peuvent pas dégrader le lactose soit une ONPG-hydrolase autre qu'une β – galactosidase.

- **Citrate de Simmons**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C ± 1°C pendant 24 heurs

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (Marchal et *al.*, 1991).

- **Recherche de l'arginine dihydrolase**

Cette enzyme est mise en évidence en ensemençant, avec une culture fraîche, un tube de milieu Möeller (voir Annexe6) de base exempte d'arginine et un autre additionné d'arginine à 1%. Les deux tubes sont recouverts avec de la vaseline stérile. Après incubation à 37°C pendant 24 à 72 heures, la croissance des bactéries dans le milieu de base se manifeste par un virage de la couleur du milieu au jaune, ce qui signifie l'acidification du milieu suite à la dégradation du glucose Dans le second tube, si la souche dégrade l'arginine, elle produit une amine qui va neutraliser les acides produits lors de la première étape (métabolisme du glucose) conduisant à une augmentation du pH du milieu qui se manifeste par le virage de la couleur du jaune au violet (Möeller, 1955 ; Guiraud, 1998).

- **Etude du type fermentaire**

Ce test permet de montrer la nature de fermentation des sucres : homofermentaire ou hétérofermentaire. Les souches sont cultivées dans 10ml de milieu MRS liquide avec du glucose au lieu du lactose, contenant une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24 à 72 heures, le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz, par contre dans le cas d'un métabolisme hétérofermentaire, la croissance se manifeste par l'apparition d'un trouble avec production de gaz recueillie dans la cloche de Durham (Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Bourgeois et Leveau, 1980).

- **Le lait de Sherman**

Le but de ce test est de bien différencier entre deux genres bactériens appartenant au groupe des bactéries lactiques qui sont *Lactococcus* et *Enterococcus*. De ce fait on a basé sur cette identification de la réduction de la couleur bleu de bleu de méthylène et la coagulation du lait.
On a préparé le lait écrémé mélangé avec l'indicateur coloré le bleu de méthylène à différentes concentration (1% et 3%). Après stérilisation on verse quelques gouttes de la suspension bactériennes (les isolats en suspension) sur le lait de Sherman (1% et 3%), incubé à 24h/30°C **(Leveau*et al.*, 1991)**
Les bactéries qui provoquent la réduction de la couleur bleu et coagulation du lait à 3% sont des entérocoques tandis que celle qui poussent à 1% sont des *lactocoques*.

2.4. Test technogique

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H_2O_2) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (Klaenhammer, 1988).

2.4.1. La conservation des souches

La conservation de nos souches était réalisée par l'ensemencement d'une colonie sur une gélose inclinée, après incubation à 30°C pendant 24h, les géloses sont conservées à 4°C.

2.4.2. Criblage des souches productrices d'acide lactique

Le criblage de la souche qui produit la plus grande quantité d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène a été réalisé en utilisant 100 ml de jus de datte supplémenté par les éléments suivants : NH_4Cl (0.7g), Tween80 (1ml), $MgSO_4$ (0.1g), $MnSO_4$ (0.02g), K_2HPO_4 (1g), $CaCl_2$ (1g). La fermentation est réalisée dans un bain mari agité pendant 96 heures à 30°C (conditions de l'expérience n° 13).

2.4.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode directe : Fleming et al. (1975) avec modification (Figure7)

Il s'agit de chercher l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées à partir du produit laitier, en se basant sur la détection des bactériocines par l'apparition des zones d'inhibition sur milieu solide.

Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les souches lactiques ont été inoculées dans des puits creusés à la surface du milieu MRS solide à partir d'une culture de 24h, les boites sont séchées à température ambiante pendant 2h. Après 24h d'incubation chaque spot est recouvert avec une goutte de gélose (TSA) maintenue en surfusion (50°C). Cela permet de fixer les colonies et éviter leur dispensions (Larpent-Gourgaud et al., 1997). Une couche de gélose moelle (0.75%) (annexe6) contenant 0.1 ml d'une culture liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène), est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

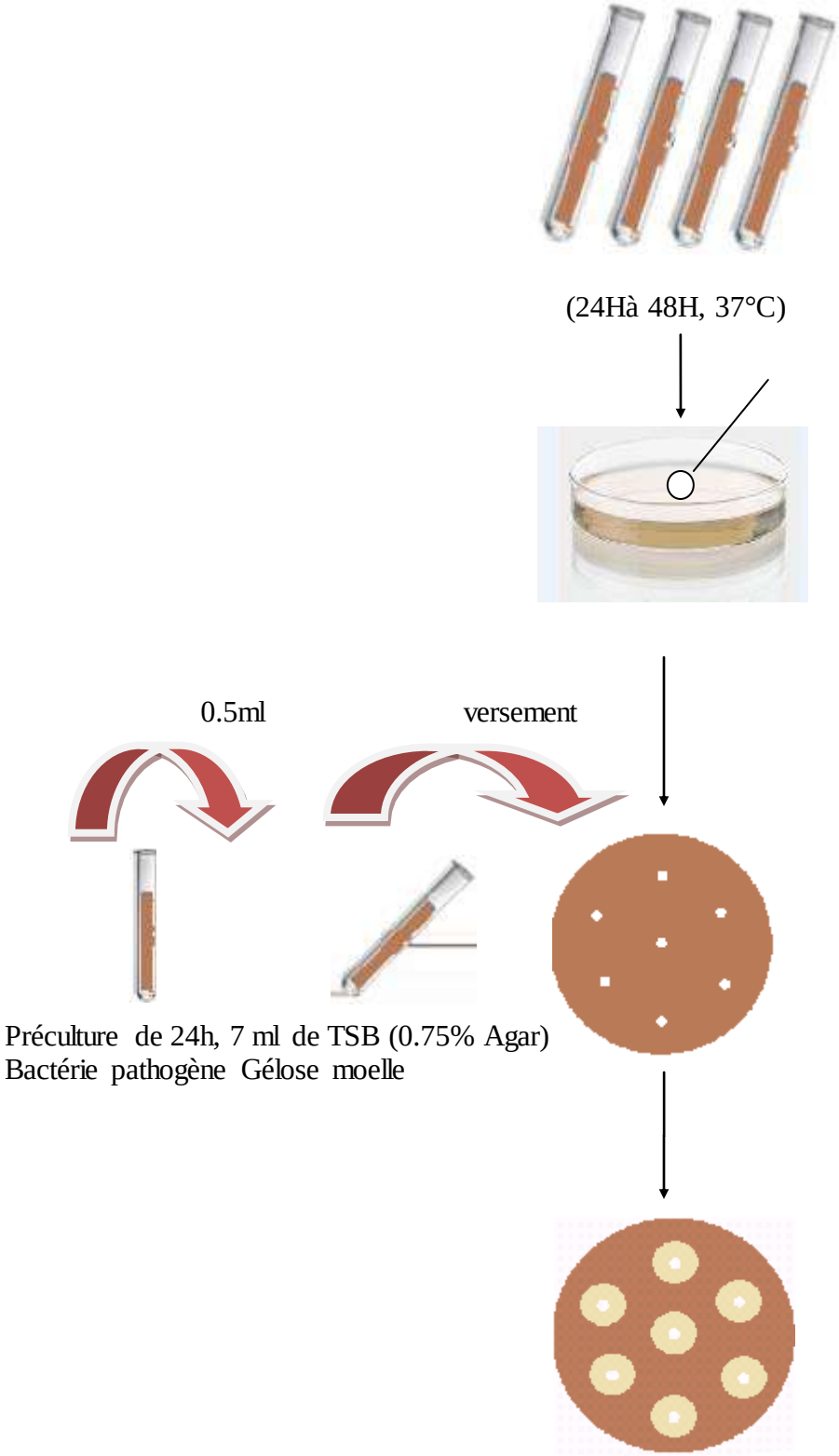


Figure7 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots (la formation d'un halo claire autour du spot indique la présence d'une activité inhibitrice) (Ababsa, 2012).

La lecture des bittes (zone claire) s'effectue après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

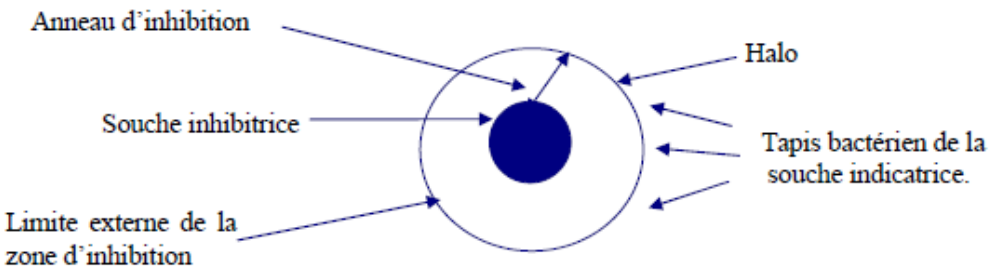


Figure8 : Représentation schématique d'un halo d'inhibition (Chemlal, 2013).

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Tabak, 2007). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

Zi en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits (5 mm).

2.4.4. Les fermentations

Dans ce travail toutes les expériences réalisées ont été planifiées en utilisant la méthode des plans d'expériences. Dans le but de produire l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène et l'étude des facteurs qui influencent cette production ainsi que la détermination des conditions optimales en utilisant la fonction de désirabilité. Et pour se faire on a choisi le plan composite centré en utilisant un plan fractionnaire et quatre expériences au centre du domaine expérimental pour estimer l'erreur expérimental. La matrice d'expérience est présentée ci-dessous (tableau15)

Tableau15 : La matrice expérimentale.

N° exp	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8
1	+	+	-	+	+	+	-	-
2	-	+	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	+	-	+	+	+
4	-	+	-	+	+	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+	-	+
6	-	-	-	+	-	+	+	-
7	+	-	-	-	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0

Les fermentations ont été réalisées en utilisant des erlenmeyers de 250ml avec un volume utile de 100ml mené a des fioles erlenmayer de 250ml avec une agitation modéré. Différents facteurs physico-chimiques peuvent influencer ce bioprocédé de production de biomolécules à savoir la température et le temps d'incubation, la concentration des éléments minéraux ainsi que la quantité de tween 80. Les différents facteurs étudiés dans ce travail ainsi que leurs niveaux de variation sont présentés dans le tableau16

Tableau16 : Les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience.

	Facteur	Valeur des facteurs		
		-1	0	+1
Température d'incubation (°C)	X_1	20	30	40
Temps d'incubation (h)	X_2	24	72	120
NH_4Cl (g)	X_3	0	0.7	1.4
Tween 80 (ml)	X_4	0	1	2
$MgSO_4+7H_2O$(g)	X_5	0	0.1	0.2
$MnSO_4$(g)	X_6	0	0.02	0.04
KH_2PO_4(g)	X_7	0	1	2
$CaCl_2$(g)	X_8	0	0.5	1

2.4.4.1. Préparation du milieu de fermentation

Il contient essentiellement le jus de datte comme source de carbone bon marché additionné deNH_4Cl, Tween 80, MgSO4. $7H_2O$, $MnSO_4$, K_2HPO_4, CaCl2. H_2O à différentes proportions.

2.4.4.2. Préparation de Préculture

En règle générale, les précultures pour les fermentations du bioréacteur discontinu au niveau de laboratoire sont réalisées dans des tubes à essai de 10% de volume réactionnel mis à l'étuve à 37°C sans aucune agitation, ni régulation de pH.

2.4.4.3. Réalisation des fermentations

Le milieu de culture réparti dans des erlenmeyers de 250, un bain marrie agité est utilisé comme incubateur pour assurer une température fixe et une agitation moyenne durant tout le temps de fermentation. Afin d'assurer une bonne homogénéisation et un bon transfert de matière.

2.4.5. Etude cinétique de la fermentation lactique

L'exécution du plan d'expérience nous a permis de déterminer l'expérience donnant la plus grande quantité d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène. Afin de comprendre ce qui se passe, une étude cinétique a été réalisée. Dans cette cinétique on a étudié la consommation de substrat et l'évolution de pH et de la biomasse, d'acide lactique ainsi que le peroxyde d'hydrogène.

Les prélèvements sont effectués en cours de fermentation, chaque 24h. La densité optique est lue immédiatement et le reste de l'échantillon est centrifugé. Les surnageant sont récupérés et conservés, les différents dosages étant réalisés ultérieurement.

2.4.5.1.Les équations des bilans



Figure9 : Représentation d'un bioréacteur discontinu.

V : volume du milieu (ml)

X : concentration en biomasse ($g.l^{-1}$)

S : concentration en substrat ($g.l^{-1}$)

P : concentration en produit ($g.l^{-1}$)

A partir des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de formation de produits, il est possible de calculer les différentes vitesses à chaque instant (t) en déterminant la dérivée de la variable considérée par rapport au temps. La vitesse spécifique instantanée de chaque variable (X, S, P) est définie par le rapport entre la dérivée de la variable considérée par rapport au temps et la valeur de la biomasse X à cet instant. Les bilans matières de la biomasse X, du substrat S et du produit P, donnent :

$$r_X = \frac{dX}{dt} \; ; \; r_S = \frac{dS}{dt} \; ; \; r_P = \frac{dP}{dt} \; ; \; \mu = \frac{rx}{x} \; ; \; q_S = \frac{rs}{x} \; ; \; q_P = \frac{rp}{x}$$

r_X : vitesse de croissance ($g.l^{-1}.h^{-1}$)

r_S : vitesse de consommation du substrat ($g.l^{-1}.h^{-1}$)

r_P : vitesse de production d'un produit ($g.l^{-1}.h^{-1}$)

μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})

q_s **:** vitesse spécifique de consommation du substrat ($g.g^{-1}.h^{-1}$)

q_p : vitesse spécifique de production d'un produit ($g.g^{-1}.h^{-1}$).

2.4.5.2. Test d'acidification

L'activité acidifiante est un critère de sélection de première importance, ce test est réalisé en mesurant la cinétique d'acidification de la souche choisie cultivée en erlenmayer sur milieu à base de jus de dattes. Ce test est basé sur deux critères :

- Le critère ΔpH correspond à l'écart de pH entre le temps initial et la fin de la culture
- $\Delta pH = (pH_i - pH_f)$: il permet de déterminer le pouvoir d'acidification globale de la souche.

- Le second se résume par la vitesse globale d'acidification obtenue en divisant $\frac{\Delta pHmax}{2}$ par le temps nécessaire à l'obtention de $\frac{\Delta pHmax}{2}$ ce critère $\frac{(\Delta pHmax)}{2t}$ donne une indication de la vitesse d'acidification de la souche.

2.4.5.3.Croissance et Mortalité

- **La croissance** est généralement caractérisée par le taux de croissance qui suit la loi de MONOD (1942) **:**

$$\mu = \frac{1}{X}.\frac{dx}{dt} = \mu max \frac{S}{Ks + S}$$

Avec: $X=X_0+ Y_{x/s} (S_0-S)$

Où:

μ : est le taux de croissance (h^{-1})

μ_{max} : est le taux de croissance maximum (h^{-1})

S est la concentration en substrat (g/l)

Ks est la concentration pour laquelle $\mu = \mu_{max}/2$ (g/l)

La vitesse spécifique maximale de croissance μ_{max} est obtenue, après intégration de l'équation différentielle provenant de l'écriture du bilan en biomasse, à partir du tracé du logarithme népérien de la concentration de biomasse en fonction du temps lnX=f(t). μ_{max} en (h^{-1}).

- **La mortalité :** le taux de mortalité de la souche k_d en (h^{-1}), suit les lois de type exponentiel suivantes :

✓ $X = Xo.e^{(\mu max.t)}$ ⟵ aux phases de croissance exponentielle

✓ $X = Xo'.e^{(-kd.t)}$ ⟵ aux phases de latence.

Avec Xo et Xo' : concentrations en biomasse (g/l) respectivement au moment de l'ensemencement et à la phase de latence.

2.4.5.4.Rendements

Les rendements globaux Yx/s et $Y_{p/s}$ sont définis comme les rapports de masse de biomasse (poids de cellules sèches) (X) et de produit (P), par la masse de substrat carboné consommé (S) respectivement depuis le début de la fermentation :

$$Y_{x/s} = \frac{X-X0}{S0-S} \qquad Y_{p/s} = \frac{P-P0}{S0-S}$$

S_0 : concentration de substrat dans le fermenteur à t = 0 ($g.l^{-1}$).

$Y_{X/S}$: rendement apparent de production de biomasse à partir du substrat ($g.g^{-1}$).

2.4.5.5.Productivité volumétrique

La productivité volumétrique est la quantité de produit par unité de temps et de volume du fermenteur.

$$\delta = \frac{P - P0}{d}$$

Avec :

d : durée de la fermentation (h)

δ: productivité volumétrique ($g.l^{-1}.h^{-1}$).

2.4.5.6.Productivité spécifique

La productivité spécifique est la quantité de produit par unité de temps et par gramme de la biomasse.

$$\Delta = \frac{P - P0}{X} . 1/d$$

Avec :

d : durée de la fermentation (h) et

Δ: productivité spécifique ($g.g^{-1}.h^{-1}$).

3. Méthodes d'analyse

3.2. Détermination du pH

Le pH est déterminé à l'aide du pH d'un mètre

3.3. **Estimation de la biomasse**

La biomasse est évaluée par spectrophotométrie à 620 nm. Une corrélation entre les unités DO mesurées et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec est établie pour le spectrophotomètre utilisé.

3.4. Dosage des sucres par la méthode de Dubois

Principe :

Cette méthode permet le dosage des oses en utilisent le phénol et l'acide sulfurique concentré. En présence de ces deux réactifs, les sucres donnent une couleur jaune, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux. La densité optique est déterminée à 492 nm.

Protocole

- Préparer une solution de glucose (solution mère) de 1g/l puis des dilutions de 0.2g/l, 0.4g/l, 0.6g/l, 0.8g/l, 0.9g/l sont réalisés à partir de cette solution ;

- Introduire 1ml de ces solutions filles dans des tubes à essais sans oublié le blanc (eau distillé) ;
- Ajouter à cette gamme 1ml de phénol à 5 % ;
- Ajouter 5ml d'acide sulfurique concentré ;
- Agiter
- Introduire les tubes dans un bain marie bouillant pendant 5 min puis refroidir les tubes pour arrêter la réaction ;
- Laisser la réaction se faire à l'obscurité pendant 30 min.
- Faire une lecture dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 492 nm.

3.5. Dosage de l'acide lactique

Principe

L'acidité titrable des échantillons (10 ml) a été mesurée par titration (Hais et *a*l., 1988) à l'aide de NaOH0.02 M jusqu'à ce que le pH atteigne 8.6. L'acidité est exprimée en (g/l).

Protocole

- Centrifuger le milieu de fermentation a 5000 rpm pendant 5 minutes.
- On prend 10 ml de l'échantillon est titré avec NaOH (0.02 M) jusqu'à pH 8.6.

L'acidité est exprimée en équivalent acide lactique (g/l).

L'équation de mesure de la concentration d'acide lactique :

$$[\mathrm{AL}] = \frac{VNaOH\,.PMAL}{V\text{éq}}[NaOH]$$

Avec :

[AL] : concentration de l'acide lactique en (g/l)

[NaOH] : concentration de NaOH en (g/l).

PM_{AL} : poids moléculaire d'acide lactique 90 g/mole

$V_{éq}$: Volume de l'échantillon 10ml.

V_{NaOH} : Volume de dosage en (ml).

3.6. Dosage de peroxyde d'hydrogène par le permanganate

Principe

Nous allons effectuer le dosage de H_2O_2par titration au permanganate de potassium $KMnO_4$ selon la réaction :

$$5\ H_2O_2 + 2\ MnO_4^- + 6H_3O^+ \longrightarrow 5\ O_2 + 2\ Mn^{2+} + 14\ H_2O$$

La fin du dosage est marquée par la persistance d'une couleur rose des ions MnO_4^-.

Protocole

- Prélevez un volume de10ml de l'échantillon à analyser ;
- Ajoutez 10ml d'acide sulfurique 1M ;
- Ajouter 20ml d'eau distillé ;
- Titrer par $KMnO_4$ (0.02M) jusqu'au virage au rose, la coloration rose doit persister au moins 30 secondes.

L'équation de mesure de la concentration de H_2O_2 :

$$[\mathrm{H2O2}] = \frac{5V\mathrm{H2O2}}{2V\mathrm{éch}}[KMnO4]$$

Avec :

$[H_2O_2]$: concentration de H_2O_2 en (mol/l)

$[KMnO_4]$: concentration de $KMnO_4$ (0.02M)

$V_{éch}$: Volume de l'échantillon 10ml.

V_{H2O2} : Volume de dosage en (ml).

3.7. Précipitation de l'acide lactique

La cristallisation de l'acide lactique sous la forme de lactate de calcium peut être envisagée en tenant compte des impératifs économiques et techniques des industriels.

Pratiquement tout l'acide lactique est sous la forme de calcium lactate selon l'équation suivante :

$$C_3H_6O_3 + Ca(OH)_2 \longrightarrow CH_3CHOHCOO\text{-}Ca^{2+} + 2H_2O$$

Acide lactique — hydroxyde calcium — Lactate de calcium

Les étapes de la précipitation sont les suivantes :

- Réaliser une fermentation lactique, dans notre travail, nous avons réalisé une fermentation lactique sur milieu MRS ;
- A la fin de la fermentation, centrifugez à 5000 r.p.m pendant 5 min ;
- La précipitation du lactate de calcium se fait à l'aide de l'hydroxyde de calcium en ajoutant 0.5 g d'hydroxyde de calcium pour 1g/l d'acide lactique ;
-Agiter bien jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène ;
-Mettez le mélange à 4°C pendant une nuit ;
-filtrez, séchez et pesez le précipité.
-Après filtration, séchage on a récupéré le lactate de calcium et analyser par spectroscopie infrarouge.

Chapitre 5

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des souches

L'ensemencement des échantillons du lait ou de l'ben sur milieu MRS nous a permis d'isoler cinq souches différentes sur le plan morphologique. On les a nommées respectivement LB_1, LB_2, LB_3, LB_4 et LB_5. Le tableau17 résume l'origine et les caractéristiques de chaque souche.

Tableau17 : Les différentes souches et leur milieu d'isolement.

Les bactéries	L'origine	Dénomination
Bactérie 1actique	Gélule	LB_1
Bactérie 1actique	l'ben	LB_2
Bactérie 1actique	Lait de vache	LB_3
Bactérie 1actique	l'ben	LB_4
Bactérie 1actique	Lait de vache	LB_5

2. L'identification des souches

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du lait de vache par les procédures phénotypique conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

2.1. Examen macroscopique et microscopique

On obtient des colonies muqueuses 1 à 2 mm de diamètre arrondis régulièrement, bombée avec une couleur blanchâtre à jaunâtre. La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (Figure10).

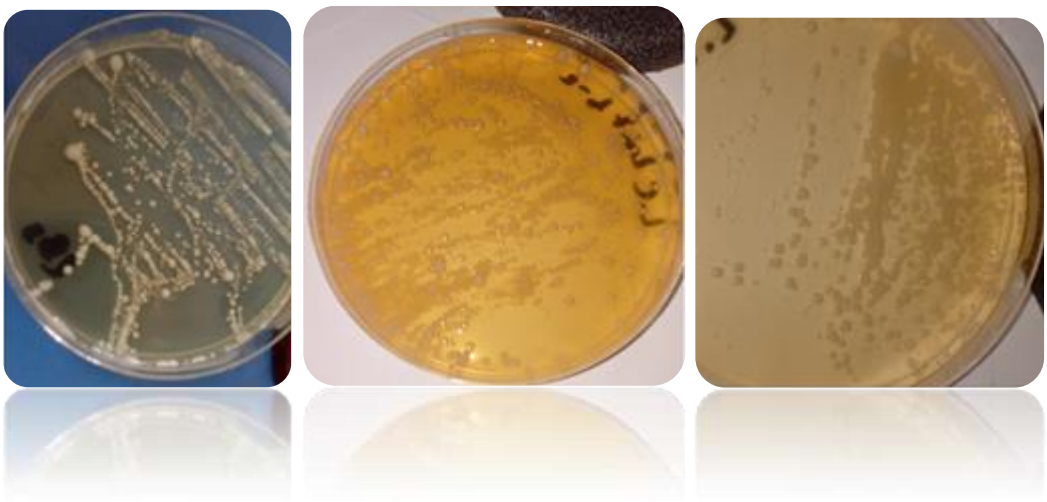


Figure10 : L'aspect macroscopique des différentes souches sur milieu MRS.

Sur milieu liquide, la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène fumeux dans le milieu MRS liquide, ce trouble est concentré au fond de tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries (Kihal, 1996; Carr et al., 2002)

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram (Figure11).L'observation microscopique a révélé que les colonies isolés et purifiés sont Gram positif, apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. Cette observation a montré que les souches étudiées sont des *coccis* et des *bacilles* (tableau18).

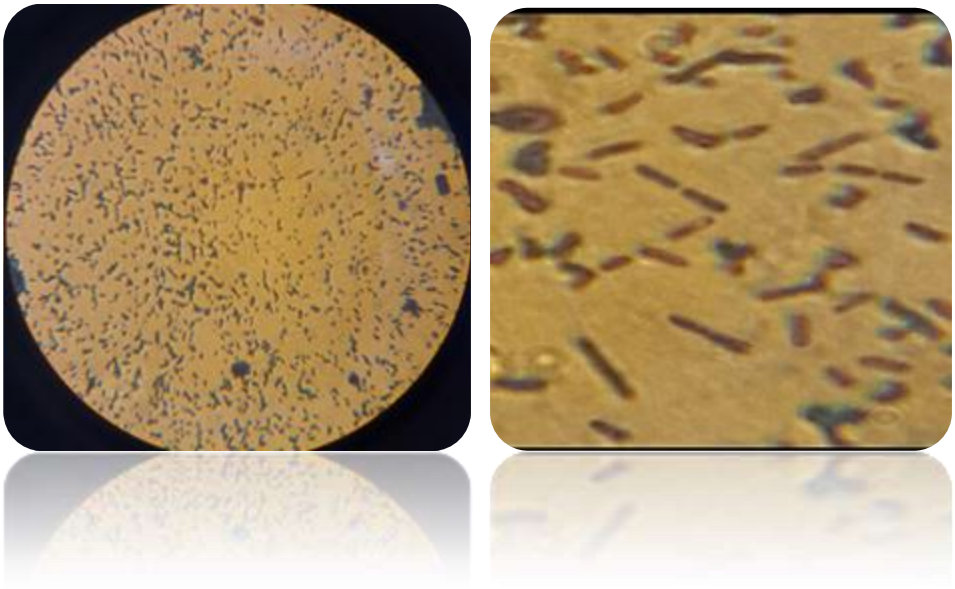


Figure11 : Observations microscopiques des bactéries lactiques avec un grossissement X100.

2.2. Test de la catalase et de l'oxydase

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée (Guiraud, 2003). Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003). Toutes les souches lactiques isolées sont à catalase négative car on a marqué l'absence de dégagement gazeux (O_2). Les souches retenues sont oxydase négatif pas de coloration violette (Figure12).

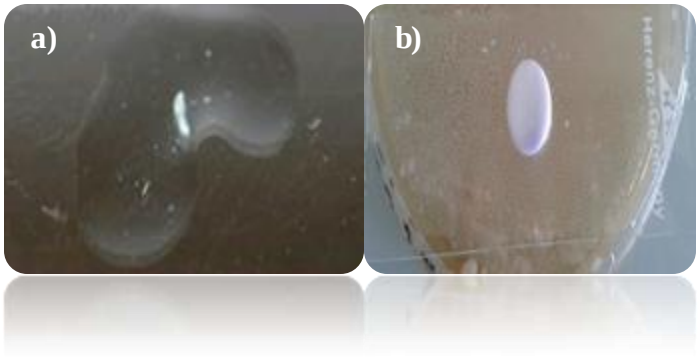


Figure12 : Résultats du test (a) catalase et l'oxydase (b) des souches isolées

Les résultats de l'étude macroscopique, microscopique ainsi que ceux des tests de la catalase et de l'oxydase sont récapitulés dans le tableau18.

Tableau18 : Récapitulation des résultats de l'examen macroscopique et microscopique et les tests de la catalase et de l'oxydase.

	Coloration de Gram	Catalase	Oxydase	Etat frais	
				Forme	Regroupement
LB_1	+	-	-	Bacille	isolées
LB_2	+	-	-	Bacille	isolées
LB_3	+	-	-	Bacille	isolées
LB_4	+	-	-	Bacille	isolées
LB_5	+	-	-	Cocci	Chainettes / isolées

+ : positif, - : négatif.

2.3. Résultats des tests physiologiques

Les tests réalisés ont montré que :

- Toutes les souches isolées sont capable de se croitre sur le bouillon MRS avec une concentration de 2% et 4% de NaCl ;
- Les trois souches LB_1, LB_3 et LB_5, n'ont pas pu croitre sur le milieu dont les concentrations sont de 6.5% ;
- Toutes les souches isolées sont capable de croitre sur le bouillon MRS à pH 4.4, seule la souche LB_3 qui possède la capacité de croitre à pH 9.6 ;



Figure13 : Effet du pH sur la croissance des bactéries lactiques isolées.

- Toutes les souches de bactéries lactiques sont capables de se multiplier à la température de 37°C et 45 °C, sauf la souche LB_4 qui n'a pas pu se développer à 45°C ;



Figure14 : Effet de la température sur la croissance des bactéries lactiques isolées.

- Par contre à une température de 2°C, aucune souche n'a pu se développer ;
- On a constaté également que toutes les souches sont thermorésistantes, ou nous avons observé une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63.5°C à l'exception de la souche LB_3 (Figure15).



Figure15 : La Thermorésistante des bactéries lactiques isolées.

2.4. Résultats des tests biochimiques classiques :

- Test Uréase :

La production d'uréase se matérialise par un changement de la coloration au rouge du fait de l'alcalinisation du milieu. En utilisant le milieu Urée-Indole pour rechercher cette enzyme, nous avons obtenu résultat négatif pour toutes les souches.

- Test VP et RM

Le test VP (Vosges-Proskauer) s'est fait sur le milieu Clark et Lubs et met en évidence la production d'acétoïne. Si le milieu reste incolore donc le test VP est négatif comme les souches LB_1, LB_2, LB_4 et LB_5, par contre si le milieu donne une couleur rose à rouge donc le test VP est positif c'est le cas de la souche LB_3. Concernant le test RM, la souche LB_3 est RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle. Alors que LB_1, LB_2, LB_3, LB_4 et LB_5 étaient RM négatif car le milieu n'est pas devenu rouge donc aucune réaction ne s'est produite.

- Test mannitol –mobilité

Les souches LB_1, LB_2, LB_3et LB_4 ont fermenté le mannitol dont la fermentation de ce dernier a été matérialisée par un virage du milieu au jaune. Par contre LB_5 n'a pas utilisé le mannitol.

En ce qui concerne la mobilité les bactéries mobiles doivent diffuser à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble formant un sapin. Pour les souches étudiées dans notre travail, on remarque qu'elles sont toutes immobiles.

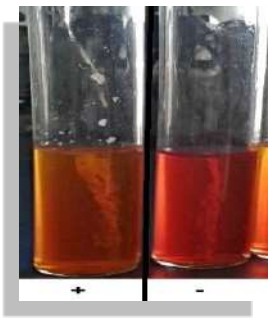


Figure16 : Résultat du test mannitol.

- TSI (Triple Sugar Iron):

- ✓ Une coloration jaune de la pente indique un lactose et/ou saccharose positif.
- ✓ Une coloration jaune du culot montre un glucose positif.

Ce test permet également la production de H_2S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz (bulles dans la gélose) (Marchal et al., 1991).

On a remarqué que toutes les souches ont fermentées le lactose et seulement LB_1 et LB_3 fermentent le saccharose et que LB_3 à fermenté le glucose. Aucune souche ne produit le sulfure d'hydrogène H_2S.

- Test ONPG :

Les souches LB_1, LB_2, LB_3 et LB_4 étaient pourvues de la β-Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG positif ou le milieu utilisé devient jaune. Alors que la souche LB_5 a donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore.

- Utilisation de Citrate :

Les souches LB_3 et LB_4 ont révélé un résultat positif pour la dégradation de citrate. Les souches LB_1, LB_2 et LB_5 n'ont pas montré aucune utilisation de citrate durant leur croissance. La fermentation des citrates est un phénomène important chez les bactéries lactiques puisqu'elle est en relation très étroite avec l'activité aromatique de ces microorganismes (Harvey et Collins, 1962).

- La recherche de l'ADH et l'ODC pour LB_3 :

Ce test a été réalisé seulement pour la souche LB_3 et on a constaté que c'est une souche qui ne possède pas ni l'ornithine décarboxylase ni l'arginine dihydrolase.



Figure 17 : Résultat du test ODC et ADH pour la souche LB_3.

- Type fermentaire :

La plupart des souches lactiques isolées à partir du lait de vache ont montré qu'elles sont homofermentaires (donc fermentent le sucre en lactate sans produire du gaz). Sauf deux souches LB_2 et LB_4 pourvues d'un caractère hétérofermentaire (présence de CO_2 dans la cloche de Durham) (Figure18).



Figure18 : Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche du Durham.

- Lait de Sherman :

Nous avons observé une réduction de bleu de méthylène par la souche LB_5 qui réduit le bleu de méthylène à 3 %après incubation à 37°C pendant 24h. L'explication de cette expérience se fonde sur le type respiratoire des souches; si ces dernières sont aérobie le cas des (*entérocoques*) elles ont besoin de l'oxygène pour compléter leur métabolisme et donc elles vont tirer l'oxygène (Rabah, 2010) présent dans le milieu ce qui provoque une diminution du potentiel redox et provoque la réduction du bleu de méthylène qui perdra ensuite sa couleur bleu car le bleu de méthylène est un colorant redox : sa forme oxydée est bleu alors que sa forme réduite est incolore (Kurmann, 1966). Si c'est le contraire, on est dans le cas des *lactocoques* qui utilisent seulement une petite quantité d'oxygène ceci indique qu'elles ne réduit que le lait à 1% de bleu de méthylène (figure19).



Figure19 : Résultat du test de lait de Sherman.

Pour qu'on puisse comparer et tenter à identifier nos souches en absence de test de confirmation, on a regroupé les résultats obtenus dans le tableau19.On remarque que la souche LB_3 est un bacille, Gram positif, homofermentaire et se développe à des températures allant jusqu'à 45°C, appartient au groupe *Thermobacterium* homofermentaire obligatoire. Elle fermente le lactose et le saccharose et possède l'arginine dihydrolase. En outre elle ne coagule pas le lait de Sherman, elle peut être rapprochée de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* (Bourgeois et Leveau, 1990).Tandis que la souche LB_1 est un bacille immobile, homofermentaire, thermophile qui fermente le lactose et saccharose, elle se rapproche de l'espèce de *Lb. acidophilus* si elle ne possède pas l'arginine dihydrolase (Tableau19). Pour la souche LB_5, les résultats montrent qu'elle a une forme sphérique, homofermentaire, thermophile ne fermente ni le saccharose ni le lactose et peut coaguler le lait de sherman et ne possède pas l'arginine dihydrolase. Elle présente également ne produit pas d'acétione (VP négatif), elle se rapproche de l'espèce *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* qui se développe à 10°C et 40°C. LB_4 est un bacille hétérofermentaire ne peut pas de développer à 45°C et capable de le faire à 15°C, elle appartient au groupe des *Streptobacterium* et se rapproche de l'espèce *Lb. casei* ssp *tolerans* qui ne fermente pas le saccharose. Les mêmes espèces ont été identifiées par Saïdi (1998) et Kacem (2003) à partir de laits crus de vaches produites dans la région de l'ouest algérien et par Zadi- Karam (1998) dans le lait de chamelle.

Alors que la souche LB_2 qui appartient également au groupe des *Bétabacterium* comme la souche Lb_4 sauf qu'elle peut se développer à 45°C et fermente le lactose et si elle peut fermenter le saccharose on peut dire qu'elle se rapproche de *Lb. fermentum*.

Tableau19 : Récapitulation des résultats de l'identification.

	type fermentaire	Température (°C)						pH		NaCl (%)		TSI										Mannitol		
		2	15	37	45	4	9.6	2	6.5	2	6.5	ADH	ODC	ONPG	Citrate	Uréase	VP	RM	Glu	Lac	Sach	mannitol	mobilité	Gaz (N_2)
LB_1	Homofermentaire	-	+	+	+	+	-	+		-		/	/	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LB_2	Hétérofermentaire	-	+	+	+	+	-	+		+		/	/	+	-	-	-	-	/	+	/	+	-	+
LB_3	Homofermentaire	-	+	+	+	+	+	+		-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LB_4	Hétérofermentaire	-	+	+	-	+	-	+		+		/	/	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
LB_5	Homofermentaire	-	+	+	+	+	-	+		-		/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : test positif, - : test négatif.

2.5. Résultats des tests technologiques

2.5.1. Criblage des souches productrices d'acide lactique

Le criblage de la bactérie lactique, parmi les cinq souches isolées, qui produit la quantité maximale d'acide lactique a été réalisé en utilisant le même milieu de culture et les mêmes conditions physico-chimiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 20.

Tableau20. Les quantités d'acide lactique produit par les souches isolées et cultivées sur le même milieu de culture.

Souche	[acide lactique] (g/l)
Lb. acidophilus	6.102
Lb. fermentum	8.244
Lb.delbrueckii* ssp *lactis	9.882
Lb.casei* ssp *tolerans	6.696
Lactococcus lactis* ssp *cremoris	6.858

Le tableau montre que la souche *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* possède une bonne aptitude à produire de l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène, dont les concentrations sont respectivement de 9.882 g/l et 0.086 mol/l. Cette souche est choisie pour continuer notre travail qui porte sur la production de biomolécules par les bactéries lactiques.

2.5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode directe

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des métabolites dans un milieu de culture solide. Les résultats obtenus ont montré la présence des zones claires d'inhibition autour des souches de bactéries lactiques isolées et ensemencées par inoculation dans des puits creusés sur le milieu MRS (Figure20). Cette observation a été faite en comparant le résultat obtenu par rapport à la souche indicatrice ensemencée seule.

La figure20, montre que différentes bactéries lactiques sélectionnées, *Lb. fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis* et *Lb. casei ssp tolerans* présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis de *Escherichia coli*. Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes (Figure20 a et a'), le diamètre d'inhibition varie de 10 mm à 12 mm (tableau21). Tandis que *Lb. acidophilus* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* ont le même spectre d'activité contre *Escherichia coli* car leur diamètre d'inhibition est de 6mm.

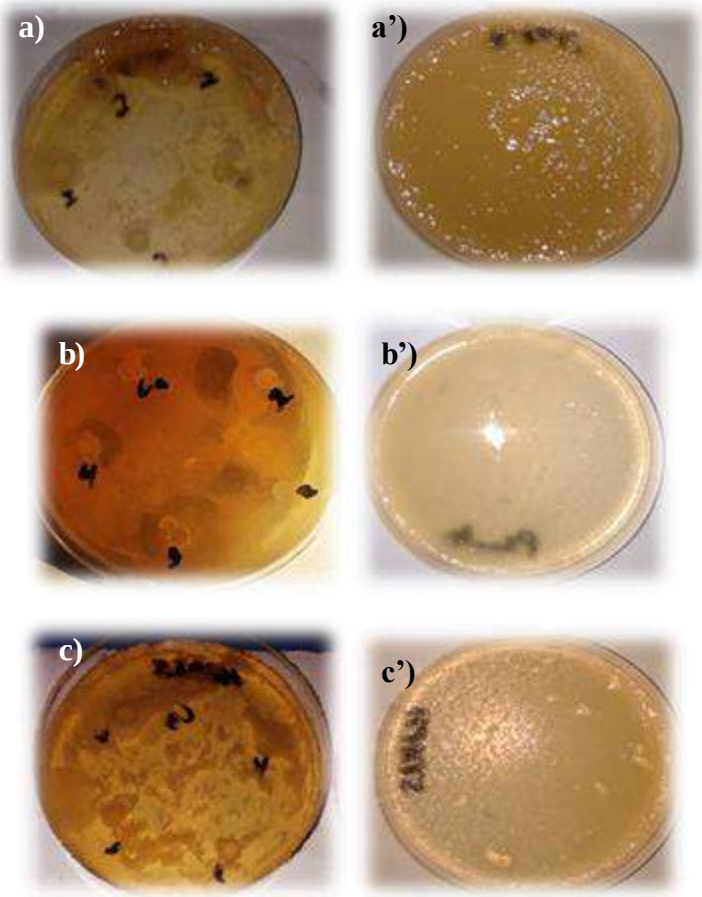


Figure 20 : Interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes et leurs témoins négatifs (a, a') *E. coli*, (b, b') *Pseudomonas aeruginosa*, (c, c') *Staphylococcus aureus* (1 : *Lb. acidophilus* 2 : *Lb. fermentum* 3 : *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* 4 : *Lb. casei* ssp *tolerans* 5 : *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*).

Staphylococcus aureus (Figure20 b et b') est sensible à toutes les souches testées (diamètre de zone d'inhibition varie de 7mm à 13mm) sauf la souche *Lb. acidophilus qui* est non inhibitrice (diamètre de zone d'inhibition = 0). Par contre l'étude de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques contre *Pseudomonas aeruginosa* a montré l'absence d'inhibition seulement par *Lactococcus lactis ssp cremoris*. Tandis que les souches montrent un diamètre d'inhibition allant de 9 à 14 mm.

Tableau21. Diamètre des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques à activité antimicrobienne.

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*	*E.coli*
Lb. acidophilus	0	14	6
Lb. fermentum	7	8	12
Lb.delbrueckii* ssp *lactis	7	9	11
Lb.casei* ssp *tolerans	13	5	10
Lactococcus lactis* ssp *cremoris	9	0	6

Le tableau, montre que :

-*Lb.delbrueckii* ssp *lactis* et *Lb.fermentum* présente spectre d'action proche contre *P. aeruginosa* et *E.coli* et *Staphylococcus aureus*;

-*Lb.casei* ssp *tolerans* présente une activité inhibitrice contre *E. coli* et *P. aeruginosa* et une forte activité inhibitrice contre *S. aureus;*

- *Lb.acidophilus* n'est efficace que contre *P. aeruginosa* et *E. coli ;*

- *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* n'est efficace que contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli.*

D'après la bibliographie, il est communément admis que le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques est très souvent lié aux propriétés acidifiantes, phénomène impliqué plus particulièrement dans l'inhibition de la flore pathogène et des germes d'altération (Smit etplumbo, 1983; Schillinger et Lucke, 1990, Byaruhanga et al., 1999). Ces propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques notamment l'acide lactique et l'acide acétique.

Le dosage de l'acide lactique produit par les souches isolées au cours de notre travail (tableau20), montre que l'acide lactique n'est pas le seul responsable de cette activité. Car on a trouvé que la souche *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* produit la plus grande quantité d'acide lactique (9,882 g/l), suivi par la souche *Lb.fermentum* avec une production de 8,244g/l, ensuite viennent les souches *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Lb.casei* ssp *tolerans* et *Lb. acidophilus* avec une production de 6,858 g/l, 6,696 g/l et 6,102 g/l, respectivement. Et si on compare ces quantités avec les spectres d'inhibition on devait obtenir une inhibition de toutes les bactéries pathogènes par *Lb.fermentum* et *Lb.delbrueckii* ssp *lactis*, qui n'est pas le cas.

En plus de l'acide lactique, ces bactéries lactiques ont la capacité de produire le peroxyde d'hydrogène qui intervient dans les phénomènes d'inhibition. En 1951, Wheater et ses collaborateurs, mettent en évidence l'inhibition de *S. aureus* par *Lb. Lactis* et l'attribuent à une

« lactobacilline ». Dès 1952, ils montrent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le *lactobacille* (Mathot et al., 1996).Il agit par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005). Le dosage de l'H_2O_2 produit par la souche (les quatre souches) *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* montre des concentrations allant de 0.072mol/l à 0.09 mol/l selon les conditions de notre travail.

A ces deux substances, s'ajoute les bactériocines qui représentent une large classe de substances antagonistes produites par les bactéries lactiques et qui varient considérablement du point de vue de leurs poids moléculaires, leurs propriétés biochimiques, leur spectre et mode d'action (Klaenhammer, 1988).

Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées. La souche bactérienne productrice de la nisine, *Lc. lactis*, est souvent utilisée lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *Li. Monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Makhloufi, 2011). En outre et selon la bibliographie *Lc. Lactis* ssp *cremoris* produit une bactériocine appelée diploccine (Mami, 2013).

La souche *Lb. acidophilus*, produit de nombreuses bactériocines, y compris lacticines B et F et acidocine J1229 et *Lb.casei* produit la caseicine 80 et *Lb.delbrueckii ssp lactis* produit lacticines A et B (Mami, 2013)

2.5.3. Les fermentations

Une deuxième série d'expériences nous permettant par la suite le choix des conditions opératoires de la fermentation (température, temps) et les concentrations optimales des besoins nutritionnels de la souche, pour cela on va appliquer le plan expérimental décrit précédemment. Ce plan expérimental fractionnaire va nous permettre d'étudier l'influence d'un grand nombre de facteur avec un nombre réduit d'expériences sur les performances de *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* (tableau15) de la matrice.

Les résultats, du dosage d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène formés lors des différentes expériences ainsi que leurs rendements et productivités volumétriques, sont présentés dans le tableau22.

Tableau22 : Les concentrations de l'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, rendements et productivité obtenus.

N° exp.	[AL](g/l)	[H_2O_2](g/l)	Rendements (%)		Productivités ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	
			Acide lactique	H_2O_2	Acide lactique	H_2O_2
1	3.45	4.59	2.41	3.21	0.03	0.04
2	8.96	4.08	6.27	2.85	0.07	0.03
3	12.24	4.65	26.4	10.05	0.51	0.19
4	8.51	4.42	5.96	3.094	0.07	0.04
5	9.52	1.768	20.55	3.81	0.40	0.07
6	12.99	5.06	28.04	10.94	0.54	0.21
7	6.15	3.23	13.27	6.97	0.25	0.13
8	7.34	10.9	5.14	7.66	0.06	0.09
9	20.02	2.38	14.02	1.66	0.16	0.02
10	9.23	4.5	6.46	3.14	0.08	0.04
11	12.09	7.24	26.1	15.64	0.50	0.30
12	4.86	3.06	10.5	6.61	0.20	0.13
13	9.88	3.06	7.89	2.44	0.10	0.03
14	10.51	2.85	8.40	2.28	0.11	0.03
15	10.31	2.95	8.24	2.36	0.11	0.03
16	10.83	2.65	8.65	2.12	0.11	0.03
MRS	14.76	1.25	10.34	0.88	0.123	0.01

2.5.3.1. L'acide lactique

Les résultats obtenus à partir des essais de fermentation montrent que *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* peut produire jusqu'à 20.02 g/l d'acide lactique sur 100ml de milieu à base de jus de dattes supplémenté. L'utilisation du milieu MRS, incubé à 40°C pendant 120h, nous a permis d'obtenir 14.76 g/l d'acide lactique (Figure21).

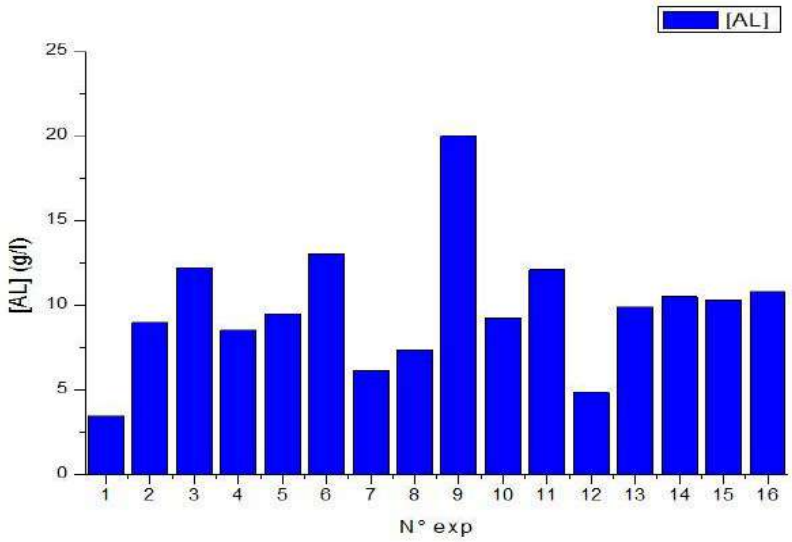


Figure21 : Représentation graphique de la production d'acide lactique selon le plan d'expérience.

D'après ces résultats on peut remarquer que la plus grande concentration en acide lactique est obtenue dans les conditions de l'expérience N°9 avec un rendement de production de 14.02% et une productivité de 0,16g.l^{-1}.h^{-1} contre un rendement de 28.04% et une productivité de 0,54g.l^{-1}.h^{-1}obtenu dans les conditions de l'expérience N°6 et 0,51g.l^{-1}.h^{-1} avec l'expérience 3.

L'étude réalisée par Meziane et al,. (2011), sur la production d'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène en utilisant 100g/l de sucre de la mélasse et les bactéries lactiques isolées du lait de vache, par une fermentation en batch à cellules libres a permis d'obtenir un rendement de 5.1% et une productivité volumétrique 0.044 g.l^{-1}.h^{-1}d'acide lactique.

Le traitement des résultats d'essai par le logiciel Statistica version 13 (évaluation), nous a permis d'obtenir les effets des 8 facteurs sur la production de l'acide lactique (tableau23). Il est à noter que *p* value permet de juger si les facteurs ont une influence statistiquement significative sur les réponses, plus *p* est faible (< 0,05) plus l'influence du facteur est importante et statistiquement significative sur la réponse.

Tableau23 : Les effets des différents facteurs sur la concentration en acide lactique.

Facteur	Effet	*p*	Coefficient
Moy /Ord.Orig	10 ,38250	0,000015	10.3826
(1) Température(L)	0,78583	0,054914	0.39292
Température (Q)	-1,12083	0,098648	-0.56042
(2) temps(L)	-0,09917	0,765462	-0.04958
(3)NH4Cl(L)	7 ,53833	0,000114	3.76917
(4)Tween 80(L)	-1,31000	0,093055	-0.65500
(5)MgSO4 ,7H2O(L)	1,26333	0,030093	0.63167
(6)MnSO4(L)	2,50500	0,035807	1.25250
(7)KH_2PO_4(L)	1,00000	0,117559	0.50000
(8)$CaCl_2$(L)	-2,09167	0,019821	-1.04583
1L*2L	1,04750	0,266883	0.523775
1L*3L	4,55500	0,002588	2.27750
1L*4L	-5,93500	0,001189	-2.96750

Le tableau montre que la température, le temps, et le tween 80, KH_2PO_4 et l'interaction de la température et le temps n'ont pas d'effet significatif sur la production de l'acide lactique (*p value*>0.05).

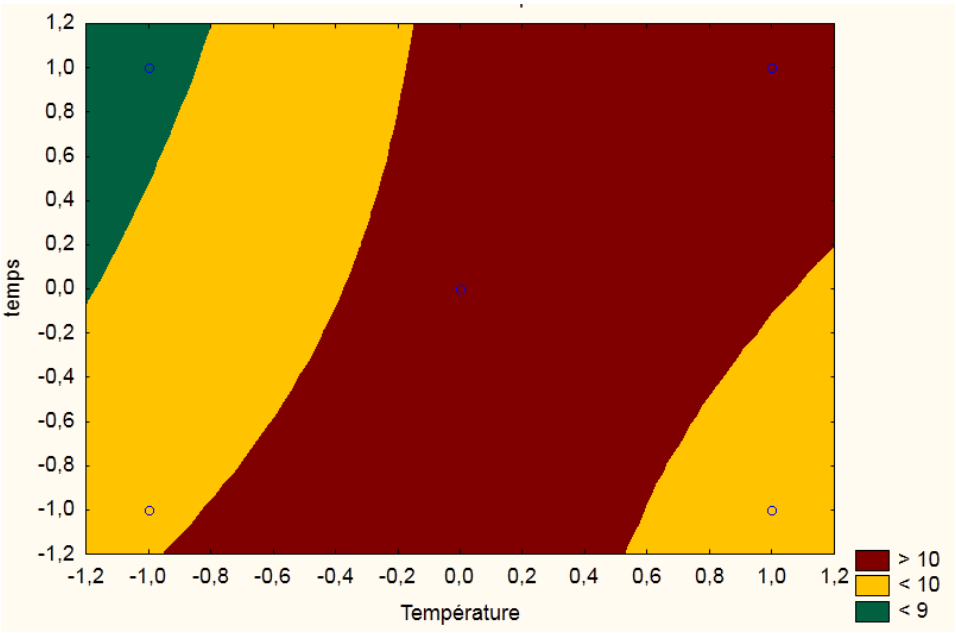


Figure22 : Effet de l'interaction entre la température et le temps d'incubation sur la production d'acide lactique.

Le graphe (Figure22) Montre que le temps et la température n'ont pas d'effet significatif sur la production d'acide lactique, ou on remarque que la concentration de l'acide lactique produit est comprise entre 9 g/l et 10 g/l quel que soit les valeurs des deux facteurs. Tandis que le $CaCl_2$ et

l'interaction de la température et le tween 80 présentent des effets négatifs significatifs avec des *p value* de 0,001189 et 0,019821, respectivement.

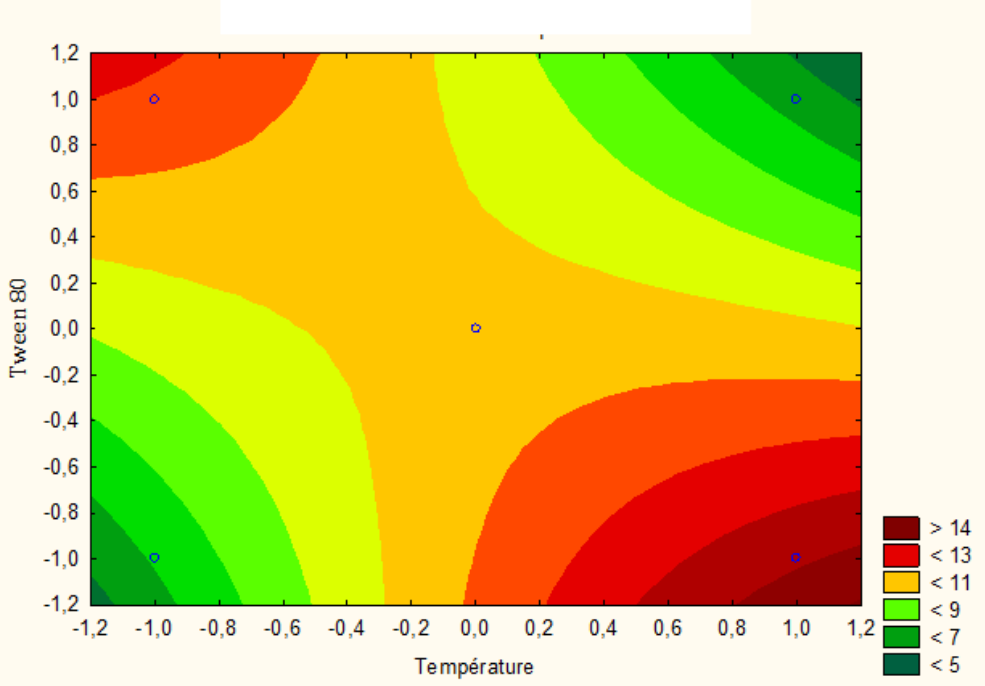


Figure23 : Effet de l'interaction entre le volume de Tween 80 et la température d'incubation.

On remarque que pour des valeurs élevées de température l'augmentation du volume de tween 80 a un effet négatif sur la production de l'acide lactique, c'est-à-dire que l'effet de la température est plus prononcé avec des faibles volumes de tween 80. La figure23 montre que l'augmentation de la température et l'augmentation de volume de Tween 80 permet d'atteindre production maximal qui varie entre 13g/l et 14g/l, ensuite elle commence à diminuer avec l'augmentation du volume de Tween 80 pour atteindre une faible production (<5g/l), avec un grand volume en Tween 80 et l'abaissement de la température on obtient une production moyenne inferieur à 13g/l donc l'effet de la température et le Tween 80 est inversement proportionnel.Un grand volume de Tween 80 provoque la lyse cellulaire et la libération d'acide lactique dans le milieu de fermentation, tandis qu'un faible volume ne crée pas de pore dans la membrane, de même que de haute température peut inhiber la croissance(Daniel MORABITO, 1994).

On note également que le NH_4Cl, $MgSO_4$, $MnSO_4$ et l'interaction de la température et NH_4Cl présentent des effets positifs avec des *p value* 0,000114, 0,030093, 0,035807 et 0,002588, respectivement.

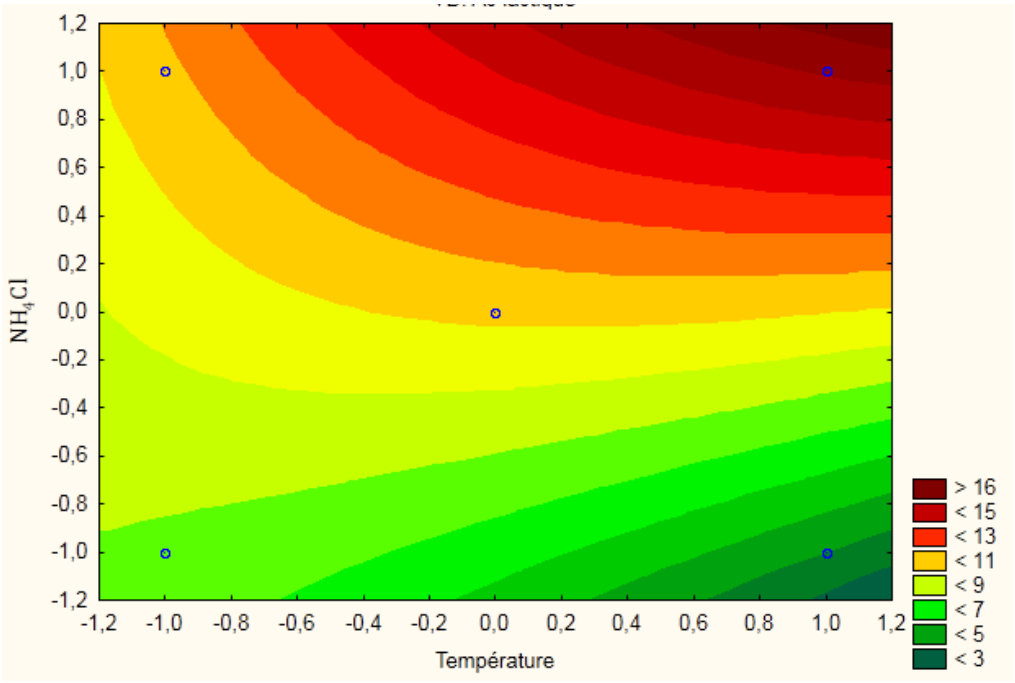


Figure24. Effet de l'interaction de NH_4Cl et la température sur la production de l'acide lactique.

On remarque que le NH_4Cl présente l'effet le plus important sur la concentration en acide lactique avec un effet de 7.53833, suivi par le $MnSO_4$ avec un effet de 2.50500. Ce- ci est peut être due à ce que le NH_4Cl est une source minérale d'azote facilement utilisable par la bactérie comme sources exogènes pour la synthèse des acides aminés. Et le manganèse joue un rôle de cofacteurs pour les enzymes du métabolisme des bactéries lactiques. De même, le $MgSO_4$présente un effet positif de l'ordre de 1,26333 et qui est une source de magnésium, et joue le rôle de régulateur dans le transport du lactose et l'acide lactique à travers la paroi bactérienne. Ce dernier joue, avec le Mn, le rôle d'activateurs de la conversion de sucres en acide lactique. Peu d'études se rapportent au rôle global des métaux dans la nutrition des bactéries lactiques. Il est cependant montré que les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} (De Man et al., 1960;Tuli et al., 1985) ainsi que le Fe^{2+} (Ledesmaetal., 1974) ont un effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique chez les lactobacilles.

Cette analyse nous a permis de conclure que le modèle qui régit la production d'acide lactique est linéaire et l'équation de régression suivante :

[Acide lactique] =10.3825+3.76917 [NH4Cl] +0.63167 [$MgSO_4$, $7H_2O$]+1.25250 [$MnSO_4$] - 1.04583 [$CaCl_2$] + 2.27750 T x [NH_4Cl]-2.96750 T x V (tween 80)……(1)

2.5.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les résultats de la production de peroxyde d'hydrogène (tableau23), montre que l'expérience N°8 donne la meilleure production avec une concentration de 10.9 g/l, alors que la plus faible concentration est obtenue avec l'expérience N°17 en milieu MRS liquide uniquement, (Figure25).Tandis que la meilleure productivité 0,3g.l^{-1}.h^{-1} est obtenue dans les conditions de l'expérience N°11.

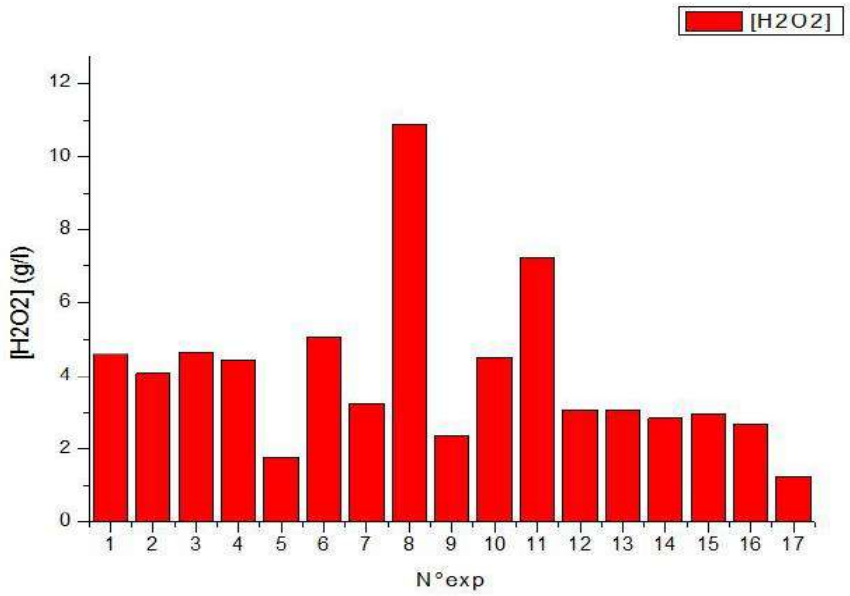


Figure25. Représentation graphique de production de peroxyde d'hydrogène selon le plan d'expérience.

L'étude réalisée par Meziane et al,. (2011), sur la production du peroxyde d'hydrogène en utilisant 100g/l de sucre de la mélasse et les bactéries lactiques isolées du lait de vache, par une fermentation en batch à cellules libres a permis d'obtenir un rendement de 0.16 % une productivité volumétrique de 0.00013 g.l^{-1}.h^{-1} le peroxyde d'hydrogène.

L'utilisation du milieu MRS nous a permis d'obtenir 0,037 mol/l de peroxyde d'hydrogène. Les résultats de l'analyse statistique des effets des différents facteurs sur la production de peroxyde d'hydrogène par la souche *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* est présentée dans le tableau24.

Tableau24 : Effet des différents facteurs sur la production de peroxyde.

Facteur	Effet	*p*	Coefficient
Moy /Ord.Orig	0,084750	0.000061	0.084750
(1) Température(L)	-0,000500	0.889423	-0.000250
Température (Q)	0,155000	0,000134	0.077500
(2)Temps (L)	0.076000	0,000298	0.038000
(3)NH_4Cl(L)	-0,045500	0.001088	-0.022750
(4)Tween 80(L)	-0,19300	0.000102	-0.096500
(5)$MgSO_4$,$7H_2O$(5)	0,012000	0,064126	0.006000
(6)$MnSO_4$(L)	0,302000	0,000056	0.151000
(7)KH_2PO_4(L)	-0,21100	0.000048	-0.105500
(8)$CaCl_2$(L)	-0,155000	0.000122	-0.077500
1L*2L	-0,350000	0.000050	-0.175000
1L*3L	0,151500	0.000156	0.075750
1L*4L	-0,161000	0.000130	-0.080500

Le tableau24 montre que le temps et $MgSO_4.7H_2O$ présentent des effets positifs statistiquement significatifs avec des *p value de* 0,038000 et 0,006000, respectivement.

Tandis que, la température, NH_4Cl, présentent des effets négatifs statistiquement significatifs avec des *p value* de 0,000250et 0,022750, respectivement. On remarque également que, le tween 80, le $MnSO_4$, KH_2PO_4, $CaCl_2$ ne présentent aucun effet sur la production de peroxyde d'hydrogène par la bactérie lactique sélectionnée dans notre travail.

Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques, les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Desmazeaud, 1996).

Le tableau24, montre que l'effet de l'interaction de la température et du NH_4Cl n'a pas d'effet significatif sur la production de peroxyde d'hydrogène. C'est-à-dire que chaque facteur agit seul indépendamment l'un de l'autre. La figure26 montre que la quantité de peroxyde d'hydrogène produite (plus de 0,31 mol/l) pour des valeurs faibles de la température et de NH_4Cl est la même que celle produite par de fortes valeurs de ces deux facteurs.

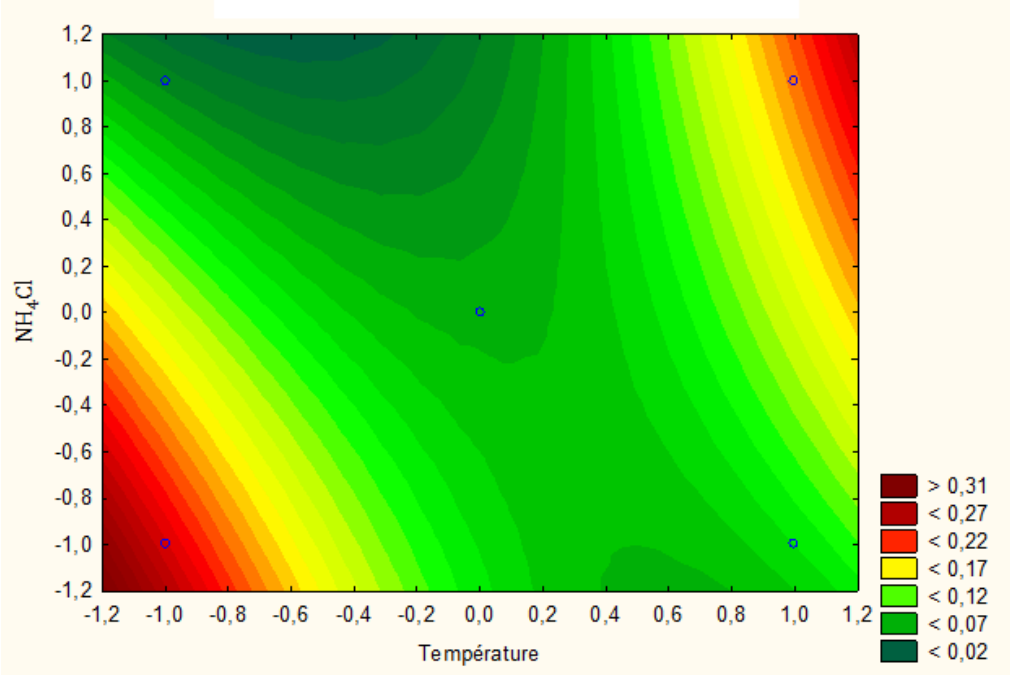


Figure26 : Effet de l'interaction de la température d'incubation et le NH_4Cl, sur la production du peroxyde d'hydrogène.

On remarque également que l'interaction de Température -temps et Température –Tween 80 n'ont pas d'effet significatif sur la production du peroxyde d'hydrogène.

Cette analyse nous a permis de conclure que le modèle qui régit la production du peroxyde d'hydrogène est linéaire et l'équation de régression suivante :

$[H_2O_2]$ = 0.07750 T + 0.038000 temps -0.022750[NH4Cl] -0.096500 Tween 80+ 0.006000$[MgSO_4,7H_2O]$+0.151000$MnSO_4$-0.105500$[KH_2PO_4]$- 0.077500$[CaCl_2]$.....(2)

L'avantage majeur qu'offre la méthode des plans d'expérience aux chercheurs des conditions optimales de deux ou plusieurs réponses à la fois est la fonction de désirabilité. L'utilisation de cette fonction nous a permis d'obtenir les conditions optimales qui nous permettent d'obtenir le maximum de productivité d'acide lactique et d'H_2O_2 (Figure27).

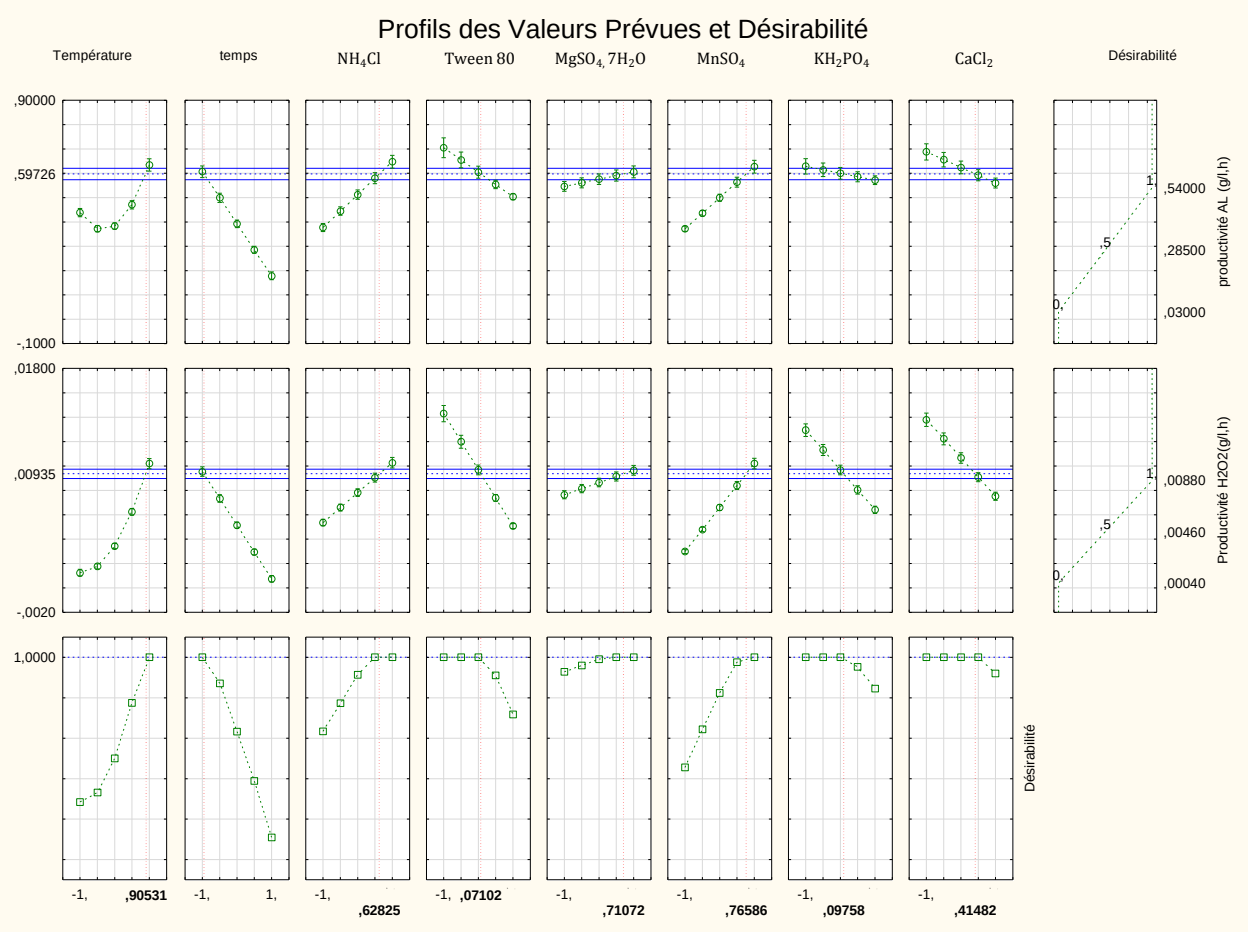


Figure 27 : Profiles de désirabilité pour l'optimisation de la productivité d'acide lactique et de H_2O_2.

Les niveaux des variables donnant la plus grande désirabilité sont choisis comme niveaux optimum. Les niveaux optimisés des variables (X1, X2, ..., X8) sont déterminées en utilisant les profils présentés dans la figure 27, pour des valeurs prévues d'acide lactique et H_2O_2 (tableau25).

Tableau25 : Les facteurs optimisés donnant les meilleures productivités.

Facteurs	Facteurs codés	Valeurs des Facteurs	Productivité prévue (mg/l.h)	
			Ac. lactique	H_2O_2
Température	0.90531	39		
temps	-1	24		
NH_4Cl	0.62825	0.74		
Tween80	0,71021	1.07	597,26	9,35
$MgSO_4$,$7H_2O$	-0,71021	0.028		
$MnSO_4$	0.76586	0.035		
K_2HPO_4	0.09758	1.09		
$CaCl_2$	0.41482	0.70		

2.5.4. Etude cinétique de la fermentation lactique

En se basant sur les résultats obtenus par l'analyse du plan d'expérience, on a choisi l'expérience N°9 (tableau26) qui a donné la plus grande concentration en acide lactique pour réaliser une étude cinétique qui nous permet de suivre l'évolution du pH, de la concentration en biomasse sèche de *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* ainsi que la concentration en acide lactique.

Tableau26. Les conditions de culture choisies.

exp	Température (^oC)	Temps (h)	NH_4Cl (g)	K_2HPO_4 (g)
9	40	120	1.4	2

Le fermenteur est ensemencé avec une préculture jeune dont les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. Des prélèvements de 5ml sont effectués chaque 24h au cours de fermentation.

2.5.4.1. Le pouvoir d'acidification globale de la souche *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*

Les résultats de l'évolution du pH du milieu de culture au cours de la fermentation par *Lb. delbrueckii* ssp *lactis*, nous ont permis de tracer le graphe présenté dans la figure 28.

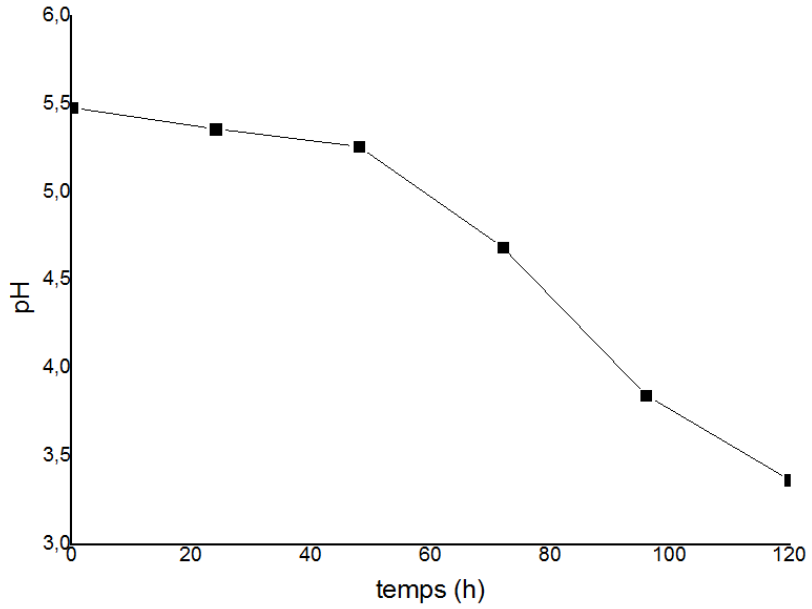


Figure28 : Evolution du pH au cours de la fermentation discontinue.

La figure28, montre que le pH reste presque stable durant la première 48h, cette stabilité est peut être liée a un agent neutralisant dans le milieu (K_2HPO_4), ensuite il diminue rapidement pour atteindre un pH de 3,37 au bout de 120h, avec un pouvoir d'acidification globale de *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* dans les conditions de notre travail est de 2.11 (unité de pH) et une vitesse d'acidification de 0.004 (Unité de pH/h).

Selon Kandler et Weiss (1986), au cours d'une fermentation lactique le pH à tendance à diminuer et la fermentation chez les *lactobacilles* est stoppée lorsque le pH atteint la valeur de 4. Ce résultat corrobore avec l'évolution de la biomasse de cette souche en fonction du temps (Figure28).

2.5.4.2. Evaluation de la biomasse

Les résultats de l'évolution de la biomasse de par *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* au cours de temps, nous ont permis de tracer le graphe présenté dans la figure 29.

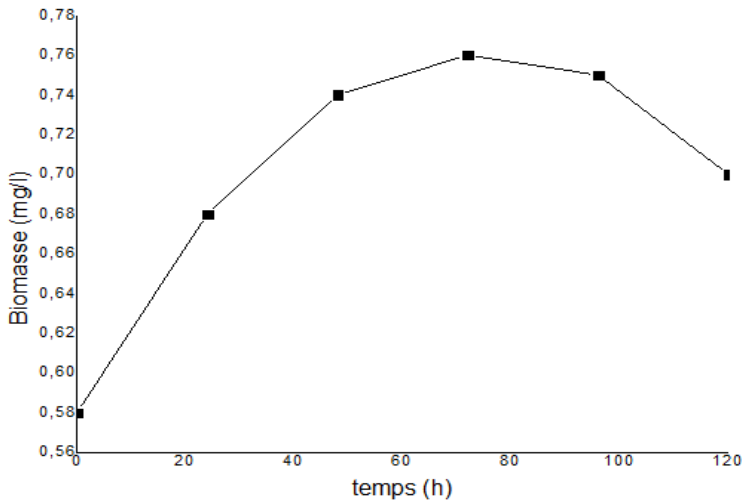


Figure29 : Evolution de la biomasse au cours de la fermentation discontinue.

Cette figure montre que *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* présente une phase exponentielle de croissance lente et faible (de 0,58mg/l – 0,74mg/l) pendant environ 48h avec un taux de croissance µmax égale à 0,005 h^{-1}. Ensuite elle entame la phase de décélération pour atteindre la phase de déclin partir de 75h, avec un taux de mortalité kd de 0,0025h^{-1}.

Cette faible production de biomasse est due au fait que le métabolisme de la bactérie lactique était dirigé, à travers sa composition riche en minéraux et en sucres, vers la production de métabolites tel que l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène et non pas pour la production de biomasse (Figure29).

2.5.4.3. Evolution de production de l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène

Les résultats de l'évolution de la concentration d'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène produits par *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* sont présentés dans la figure 30.

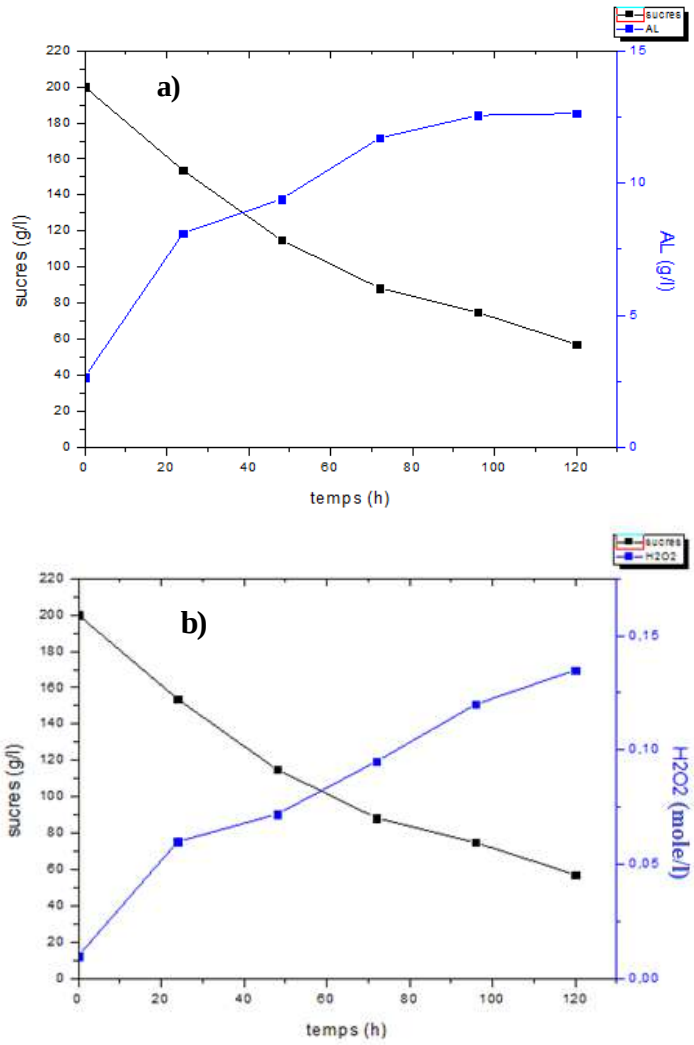


Figure30 : Evolution de la concentration des sucres totaux et (a) la concentration d'acide lactique et (b) la concentration peroxyde d'hydrogène, en fonction du temps.

La figure30(a) montre que la production d'acide lactique était continue et n'a pas cessée d'augmenté jusqu'à 72h ou elle est ralentit et devient stationnaire à partir de 96h jusqu'à la fin de la fermentation. De même que la concentration en H_2O_2 n'a pas cessé d'augmenter tout au long de la période de fermentation (Figure30 b). La concentration finale de l'acide lactique est du peroxyde d'hydrogène est 12.63g/l et 0.135 mol/l sur milieu à base de jus de dattes, respectivement.

3. Précipitation de lactate de calcium par hydroxyde de calcium

La précipitation de l'acide lactique produit par la souche *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* par l'hydroxyde de calcium a été réalisée avec l'utilisation de 10ml de milieu fermenté (exp17). 7.34g de masse sèche a été obtenu a la fin de la précipitation. L'analyse par spectroscopie infrarouge nous a permis d'obtenir les spectres présentés dans la figure 31.

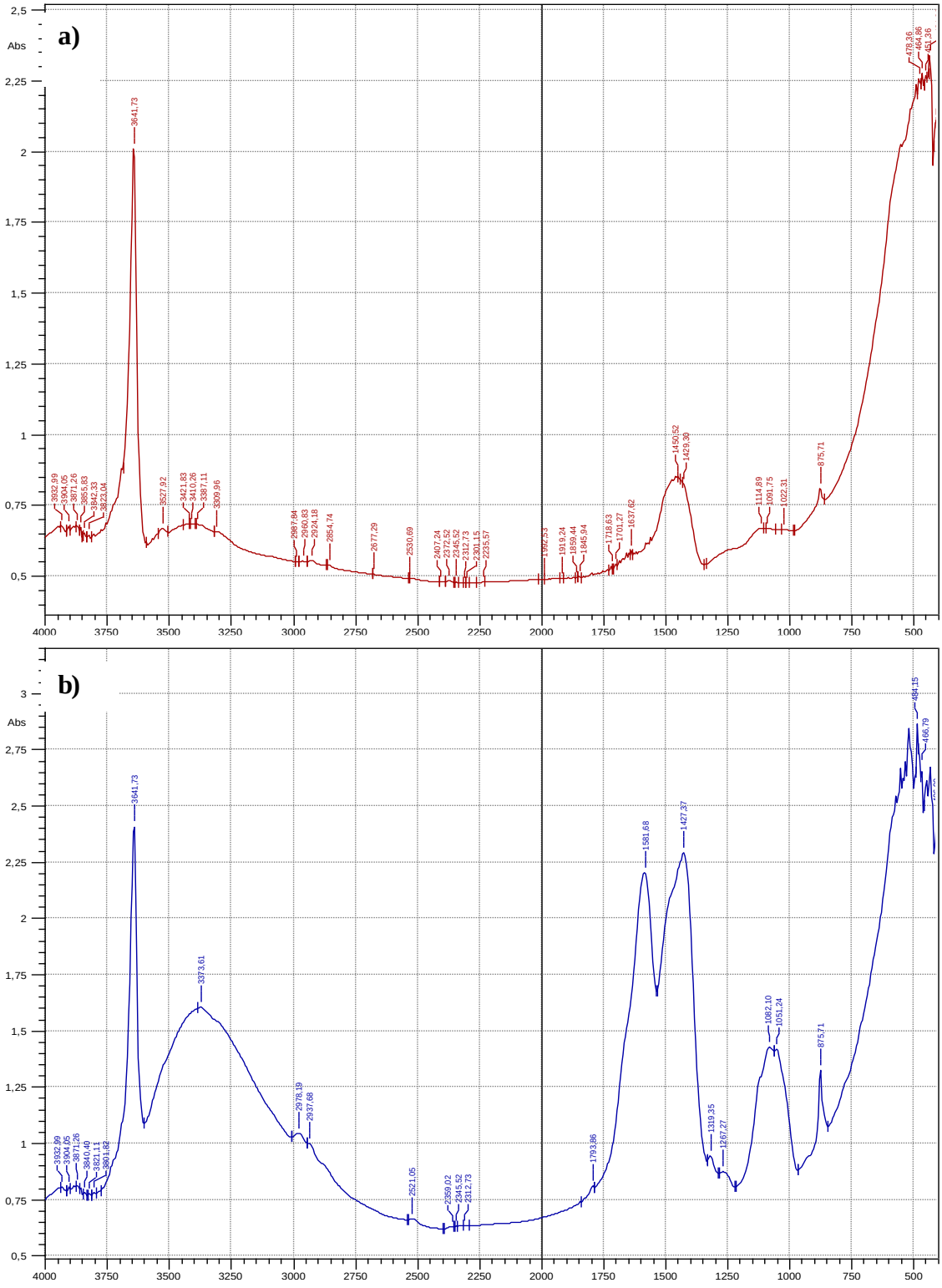


Figure31 : Spectres infrarouge de (a) l'hydroxyde de calcium et (b) Lactate de calcium précipité.

On remarque que le spectre infrarouge du lactate de calcium précipité est différent de celui de l'hydroxyde de calcium utilisé pour effectuer cette précipitation. L'analyse du spectre de lactate de calcium précipité à partir du milieu de fermentation présente des bandes intenses à 1500-

1750cm^{-1} (bande C=O), ainsi des signaux caractéristiques ont été trouvés à 3000- 3500 cm^{-1} (bande OH) et à 2750- 3000 cm^{-1} (bande CH) ainsi que à 1250- 1500 cm^{-1} (bande CH). Ce résultat est similaire à celui obtenu par Cheong (2016).

4. Application biotechnologique de la souche isolée

La bactérie lactique isolée dans notre travail a été appliquée par nos camarades pour produire la chitine et ces dérivés à partir de déchets de crevette par voie biologique. La chitine obtenue est présentée dans la figure32.

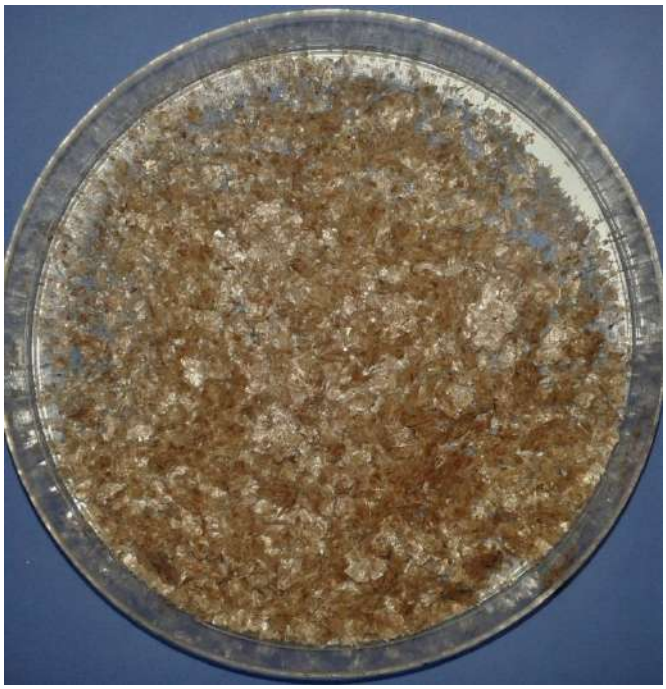


Figure32 : Application des bactéries lactiques dans l'extraction de la chitine.

Conclusion

Conclusion générale

L'objectif de notre travail est la production de biomolécules par les bactéries lactiques. Dans un premier temps, on a commencé par l'isolement, purification et l'identification de 5 souches de bactéries lactiques, nommées LB_1, LB_2, LB_3, LB_4 et LB_5, à partir du lait cru de vache et l'ben préparé par la méthode traditionnelle dans la région de Médéa.

L'identification physiologique et biochimique de ces isolats a été assurée en utilisant des méthodes classiques d'identification. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer les groupes d'appartenance ainsi que les genres et espèces qui présentent les caractères les plus proches aux caractères des bactéries lactiques isolées, donc on a pu identifier comme suit : LB_1 : *Lb.acidophilus,* LB_2 : *Lb.fermentum,* LB_3 : *Lb.delbrueckii ssp lactis,* LB_4 : *Lb.casei ssp tolerans,* et LB_5 : *Lactococcus lactis ssp cremoris.*

Notre étude s'est ensuite développée autour des souches isolées de lait de vache en examinant certaines caractéristiques d'intérêt technologique afin d'évaluer leurs potentiels pour un éventuel usage industriel. Dans cette partie, nous avons réalisé un test de criblage pour sélectionner la souche qui produit la plus grande quantité d'acide lactique (9.882 g/l) et le peroxyde d'hydrogène (0,086 mol/l) dans les mêmes conditions. Les résultats ont montré que la souche la plus performante est *Lb.delbrueckii ssp lactis*. Ainsi, l'étude de l'activité antimicrobienne pour les différentes souches isolées a révélé un spectre d'inhibition, vis-à-vis des souches pathogènes, important qui varie d'une bactérie lactique à l'autre dont on a obtenu :

-*Lb.delbrueckii* ssp *lactis* et *Lb.fermentum* présente spectre d'action proche contre *P. aeruginosa* et *E.coli*. Et *Staphylococcus aureus*;

-*Lb.casei* ssp *tolerans* présente une activité inhibitrice contre *E. coli* et *P. aeruginosa* et une forte activité inhibitrice contre *S. aureus;*

- *Lb.acidophilus* n'est efficace que contre *P. aeruginosa* et *E. coli ;*

- *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* n'est efficace que contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli.*

Ces résultats permettent au moins de fournir un ordre d'idée plus clair sur le potentiel antimicrobien des souches sélectionnées qui représentent une voie d'avenir pour la production des substances antimicrobiennes utilisées dans la bioconservation des aliments et la fermentation.

L'étude de la cinétique de la fermentation a clairement montré que le jus de dattes enrichi en élément nutritif peut être utilisé comme milieu bon marché pour la production

de l'acide lactique et du H_2O_2 dont on a obtenu environ une productivité volumétrique de 0,54g/l.h et 0,3017g/l.h d'acide lactique et d'H_2O_2, respectivement.

L'étude cinétique de la fermentation lactique, par *Lb.delbrueckii* ssp *lactis*, dans les conditions de l'expérience 9 qui a donné 20,02g/l d'acide lactique nous a permis de conclure que le pouvoir d'acidification globale, dans les conditions de notre travail, est de 2.11 (unité de pH) et une vitesse d'acidification de 0.004 (Unité de pH/h).

L'analyse par spectroscopie infrarouge du lactate de calcium précipité de l'acide lactique produit par fermentation, au cours de notre travail, par l'hydroxyde de calcium a montré l'apparition des pics caractéristiques du lactate de calcium.

On peut dire que l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail sont satisfaisants par rapport les conditions de travail et permet d'envisager plusieurs perspectives d'investigations. Les principales sont les suivantes :

- Une régulation de pH est nécessaire dans un procédé de fermentation de l'acide lactique généralement le pH est maintenu entre 4.5 et 6.4 chez les *lactobacilles* selon les espèces ;
- Il serait intéressant d'expliquer le phénomène de (non utilisation de tous les sucres présents dans le jus de dattes) et d'identifier les facteurs qui régulent le métabolisme et le transport de ce dernier. Ceci constitue un intérêt économique important et non négligeable car il s'agit d'un « manque à gagner» c'est-à-dire un gaspillage de substrat ;
-Une hydrolyse du saccharose du jus de datte par voie enzymatique (invertase) est envisageable. Ceci permettrait une consommation complète des sucres de datte et une amélioration des procédés de production d'acide lactique ;
-L'immobilisation des bactéries lactiques dans des polymères ou fixées sur des supports de différents types. Ceci pourrait augmenter la productivité. Il pourrait être intéressant de produire l'acide lactique à partir de jus de datte en utilisant des cellules immobilisées de *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* par inclusion dans une matrice de polymères.

Enfin, au vu des résultats générés lors de notre travail, nous pouvons rappeler que ces souches bactériennes isolées du lait de vache et spécialement la souche *Lb.delbrueckii* ssp *lactis* ont révélé des caractéristiques technologiques intéressantes faisant d'elles de très bonnes candidates pour d'éventuelles applications technologiques, et pourraient devenir des levains pour fermenter différents sortes de laits, et pourraient être utilisés en tant que conservateur naturel pour inhiber la croissance des microorganismes indésirables dans les aliments. Il serait aussi souhaitable de valoriser ces travaux par des tests à moyenne et à grande échelle en biotechnologie avec des évaluations complémentaires relatives aux productions de bactériocines par exemple.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- ABABSA Ahlem, 2012 Mémoire : Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. P, 38.
- Aissaoui, Z. 2004. Le fromage traditionnel algerien « bouhezza». séminaire d‟animation régional. "Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l‟innocuité des aliments", INSAT-Tunis (communication orale), Tunisie/27-28-29 novembre Actes des sommaires p 118 à 124.
- Akerberg, C. et G. Zacchi (2000). An economic evaluation of the fermentative productionof lactic acid from wheat flour. Bioresource Technology, 75, 119-126.
- Akerberg, C. et G. Zacchi (2000). An economic evaluation of the fermentative productionof lactic acid from wheat flour. Bioresource Technology, 75, 119-126.
- Alma, L. (1982). Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. Journal of Dairy Science, 65, 4, 515-520.
- Amrane, A., Y. Prigent (1998). Lactic acid production during the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. Biotechnology Letters, 20, 379-383.
- Arasaratnam, V., A. Senthuran, K. Balasubramaniam. (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Enzyme and Microbial Technology, 19, 482-48.
- ARBIA L, mémoire, Contribution à l'étude de la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace de la crevette par voie fermentaire, 2010.
- BA DIAO M., (2000) : La qualité du lait et produits laitiers. Communication à l'atelier de restitution de l'étude sur la filière lait au Sénégal. GRET / ENDA-GRAF Dakar,
- Bai, D.M., Q. Wee, Z.H. Yan, X.M. Zhao, X.G. Li et S.M. Xu (2003). Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of lactic acid. Biotechnology Letters, 25, 1833-1835.
- Bergmaier D, C.P. Champagne, C. Lacroix (2003). Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Journal of Applied Microbiology, 95, 1049-1057.
- Bogaert, J.C. (1997). Production and novel application of natural L(+) lactic acid: food, pharmaceutics and biodegradable polymers. Cerevisa, 22, 46-50.
- Caplice, E. et G.F. Fitzgerald (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation.International Journal of Food Microbiology, 50, 131- 149.
- CAROLE L. VIGNOLA, (2002) : Science et technologie du lait.

Références Bibliographiques

- Cotton, J.C, A.L. Pometto III, J. Gvozdenovic-jeremic (2001). Continuous lactic acid fermentation using plastic composite support biofilm reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 626-630.

- Daniel MORABITO, Production d'acide lactique par *lactobacillus casei* sur lactoserum: etudes cinetiques, modélisation et simulation de procède intègre, 1994.

- David Lubin, 1995. Le lait et les produits laitiers dans l'alimentation humaine.

- De Vos, W.M. et J. Hugenholtz (2004). Engineering metabolic highways in *lactococci* and other lactic acid bacteria. Trends in Biotechnology, 22, 72-79.

- Demirci, A. et A.L. Pometto (1992). Enhanced production of D(-) lactic acid by mutans of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. Journal of Industrial Microbiology, 11, 23-28.

- Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 143-154.

- F. Weber, 1985, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fitzpatrick, J.J. et U. O'Keeffe (2001). Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for producing lactic acid. Process Biochemistry, 37, 183-186.

- Ganzalez-Vara, Y.R.A., D. Pinelli, M. Rossi, D. Fajner, F. Magelli et D. Matteuzzi (1996). Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei ssp. casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis ssp.* torquens DSM 20004 in continuous fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering, 81, 548-552.

- Garde, A., G. Gonsson, A.S. Schmidt et B.K. Ahring (2002). Lactic acid production wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. Bioresource Technology, 81, 217-223.

- Gätje, G. et G. Gottschalk (1991). Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. Applied of Microbiology and Biotechnology,34, 446-449.

- GOURSAUD, J. Le contrôle de la qualité du lait, matiere premiere de l'industrie, in : CEPIL. Le lait matière première de l'industrie laitière. CEPIL-INRA, paris, 1987, 385-394.

- Guoqiang, D., R. Kaul et B. Mattiasson (1991). Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production. Applied of Microbiology and Biotechnol, 36, 3, 309-314.

Références Bibliographiques

- Guyot, J.P., M. Calderon et J. Morlon-Guyot (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. Journal of Applied Microbiology, 88, 1,176-182.
- Hofvendahl, K et B. Hahn-Hägerdal (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology, 26, 2, 87-107.
- Hujanen, M. et Y.Y. Linko (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Applied of Microbiology and Biotechnology, 45, 307-313.
- January-February, 2016 RJPBCS 7(1) Page No. 1786.
- Joseph A. Kurmann. L'´epreuve de la réductase au bleu de methyl`ene, Un test d'activité simple pour la préparation et l'analyse des levains de *Streptocoques* lactiques DANS la fabrication des fromages. Le Lait, INRA Editions, 1966, 46 (457), pp.395-405.
- Jung SJ, Jeon JM, So JS (2009). Lack of correlation between H2O2 production and in vitro anti-staphyloccocal activity of vaginal Lactobacillus spp. Afr. J. Biotechnol. 8(10): 2271-2278.
- KAGEMBEGA J. M. (1984): Contribution à l'étude de la salubrité des laits caillés et yaourt à Dakar. Th. Pharm., Dakar, n° 24.
- Klaenhammer T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie., 70 :337-349.
- Krischke, W., M. Schröder, W. Trösch (1991). Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei ssp. casei*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 34, 573-578.
- Kulozik, U., et J. Wilde (1999). Rapid lactic acid production at high cell concentration in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Enzyme and Microbial Technology, 24, 297-302.
- LAHELEC C. et COLIN P. (1991) : Méthode d'évaluation des différentes microflores à incidence technologique: la flore psychrotrophe. In : techniques d'analyses et contrôle dans les lAA, Tee. & Doc., Vol.3, 2 ème Ed., Lavoisier, Paris.
- LE BERRE? N. Le lait .EditionCharles corlet, 1999, p113-114.
- Lenoir J.Hermier J.Weber F.1992 Les groupes microbiens d'intérêt laitiers.Ed.cidil- p30-50.
- Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc, Lavoisier .Paris. 85-87*
- Liew, S.L., M. Rostarizan, A.R. Raha, YW. Ho et B.A. Arbakariya (2006). Improved production of live cells of *Lactobacillus rhamnosus* by continuous cultivation using glucose-yeast extract medium. Journal of Microbiology, 44, 439-446.
- Lipinski, E.S et R.G. Sinclair (1986). Is lactic acid a commodity chemical? Chemical Engineering Progress, 82, 8, 26-32.

Références Bibliographiques

- Lipinski, E.S et R.G. Sinclair (1986). Is lactic acid a commodity chemical? Chemical Engineering Progress, 82, 8, 26-32.
- Litchfield, J.H. (1996). Microbiological production of lactic acid. Advances in Applied Microbiology, 42, 45-95.
- Liu, J.Q, T. Kurihara, M. Miyagi, N. Esaki et K. Soda (1995). Reaction mechanism of L-2-haloacid dehalogenase of *Pseudomonas sp*. YL. Identification of Asp10 as the active site nucleophile by 180 incorporation experiments. Journal of Biological Chemistry, 270, 18309-18312.
- Lunt, J. (1998). Large-scale production, properties commercial applications of polyactic acid polymers. Polymer Degradation and Stability, 59, 145-152.
- LUQUET, FM. Laits etproduits laitiers : vache, brebis, chèvre, 1985. 3volumes. Paris, technique et documentation, Lavoisier.
- Magnuson, J.K.et L.L. Lasure (2004). Organic acid productionby filamentous fungi. In advances in fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine.Ed. Jane et Lene Lange Kluwer Academic, 307-340
- Mathol A.G., BeliardE., Thanault D., 1996. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier, pp 432-450.
- Miura, S., T. Arimura, M. Hoshino, M. Kojima, L. Dwiarti et M. Okabe (2003). Optimization and scale-up of L- lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus sp*. MK-96-1196 in airlift bioreactors. Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 65-69.
- Monod, J. (1942). Recherche sur la croissance des cultures bactériennes, Ed. Hermann et Cie, Paris.
- MONSALLIER G., (1994) cité par DIENG (2001).
- Morabito, M. (1994). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum: Etudes cinétiques, Modélisation et Simulation de procédé intégré, Thèse INPL Biotechnologies et Industries Alimentaires.
- Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1982a). Purification and properties of a new enzyme, DL-2- haloacid dehalogenase, from *Pseudomonas sp*. Journal of Bacteriology, 150, 522-527.
- Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1982b). Bacterialassimilation of D-and L-2 chloropropionates and occurrence of new dehalogenase. Archives of Microbiology, 131, 179-183.
- Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1984).Enymatic preparation of D and L lactic acid from racemic 2-chloropropionic acid. Biotechnology and Bioengineering, 26, 805-806.

Références Bibliographiques

- Mulligan, C.N. et B.F. Safi (1991). Continuous production of ammonium lactate by *Streptococcus cremoris* in a three-stage reactors. Biotechnology and Bioengineering, 38, 1173-1181.
- Narayanan, N., P.K. Roychoudhury et A. Srivasta (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology, 7, 2, 167-179.
- Nardi-Dei, V., T. Kurihata, C. Park, N. Esaki et K. Soda (1997). Bacterial DL-2 haloacid dehalogenase from Pseudomonas sp. Strain 113: gene cloning and structural comparison with D-and L-2 haloacid dehalogenases. Journal of Bacteriology, 179, 4232-4238.
- Naveena, B.J., M. Altaf, K. Bhadriah et G. Reddy (2005). Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. Bioresource Technolgy, 96, 485-490.
- O'Marro, A. (1993). Lactic acid polymers, Cargill News, 58, 4, 21-25.
- Oda, Y., K. Saito, H. Yamauchi et M. Mori (2002). Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus Rhizopus oryzae. Current Microbiology, 45, 1-4
- Oh, H., Y.J. Wee, J.S. Yun, S.H. Han, S. Jung et H.W. Ryu (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. Bioresource Technology, 96, 1492-1498.
- Ohkouchi, Y. et Y. Inoue (2006). Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus* manihotivorans LMG 18011. Bioresource Technology, 97, 1554-1562.
- Pauli, T. et J.J. Fitzparck (2002). Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic acid by fermentation with *Lactobacillus casei*. Process Biochemistry, 38, 1-6.
- Physiochemical Properties of Calcium Lactate Prepared by single-phase Aragonite Preciptated Calcium Carbonate ; Sun Hee Cheong*.
- Research Journal oh Pharmaceutical ; Biological and Chemical Sciences.
- Richter, K. et A. Träger (1994). L(+) lactic acid form sweet sorghum by submerged and solid-state fermentations. Acta Biotechnologica, 14, 367-378.
- Richter, K. et C. Berthold (1998). Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. Journal of Agricultural Engineering Research, 71, 181-191.
- Richter, K. et C. Berthold (1998). Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. Journal of Agricultural Engineering Research, 71, 181-191.
- Roble, N.D., J.C. Ogbonna et H. Tanaka (2003). L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cell immobilzedin loofa (Luffa cylindrical). Biotechnology Letters, 25, 1093-1098.

Références Bibliographiques

- Roukas, T. et P. Kotzekidou (1996). Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed reactor. Food Biotechnology, 10, 231-242.

- Roukas, T., et P. Kotzekidou (1991). Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. Enzyme and Microbial Technology, 13, 33-38.

- Roychoudhury, P.K., A. Srivasta et V. Sahai (1995). Extractive bioconversion of lactic acid. In: Fiechter, A. ed. Advances in Biotchemical Engineering Biotechnology, 53, 61-87.

- Senthuran, A., V. Senthuran, R. Hatti-Kaul et B. Mattiasson (1999). Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor. A step towards optimization. Journal of Biotechnology, 73, 61-70.

- Singh, S.K et A.P. Ahmed SU (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. Process Biochemistry, 41, 991-1000.

- Smith, B.R., R.D. McBean et G.C. Cox (1977). Separation of lactic acid from lactose fermentation liquors by reverse osmosis. Australian Journal of Dairy Technology, 77, 23-25.

- Sreenath, H.K, A.B. Moldes, P.K. Koegel et R.J. Straub (2001). Lactic acid production from agricultural residues. Biotechnology Letters, 23, 179-184.

- Venkatesh, K.V (1997). Simultanuous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Bioresource Tecnology, 62, 91-98.

- VICK ROY, T.B., 1985, Lactic acid, Ed. in Comprehensive Biotechnology, vol. 38, by MOO YOUNG M., 761-775.

- Vishnu, G., G. Seenayya et G. Reddy (2002). Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 429-433.

- Wee, Y.J., J.N. Kim et H.W Ryu (2006a). Biotechnological production of lactic acid and Its Recent Applications. Food Technology and Biotechnology, 44, 2, 163-172.

- WISEMAN D. W. et APPLEBAUM T. (1983): Distribution and resistance to pastorisation of aflatoxin MI. In naturally contamination, whole milk, cream and skin milk. Journal of food prad., 46 , 530-532.

- Yanez, R., A.B. Moldes, J.L. Alonso et J.C. Prajo (2003). Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis subsp*. Torquens. Biotechnology Letters, 25, 1161-1164.

Références Bibliographiques

- Yin, P.N, Y. Nishiya, Y. Kosakai, K. Yahira, Y.S. Park et M. Okabe (1997). Enhanced production of L(+) lactic acid from corn starch in a culture of Rhizopus oryzae using an air lift bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, 84, 249- 253.

- Yoo, I.K., H.N. Chang, E.G. Lee, Y.K Chang et S.H. Moon (1996). Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 6, 482-486

- Yun, J.S, Y.J. Wee, J.N. Kim et H.W. Ryu (2004). Fermentative production of DL- lactic acid from amylase treated rice and wheat brans hydrolysate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus sp*. Biotechnology Letters, 26, 1613-1616.

- Zalan Z., Barath A., Halasz A., 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus strains*. *Food Technol. Biotech*., 43(3) : 219-225.

(2000). *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 4112-4114.

(2005) - Should yoghurt cultures be considered probiotic? Brit. J. Nutr., *93*, 783–786.

-ALAIS C.- Sciences du lait: Principes et techniques laitiers. IVe édition, Ed. SEPArC, Paris, 1984,814 p.

-ALAIS C., 1984 : Science du Lait ; Principe des Techniques Laitières. SEPAIC, Paris.

-Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. et Klaenhammer, T.R. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 3906-3912.

-Ammor M.S. et Mayo B., 2007. Selectin criteria dfrr lactic acid bacteria t be used as functional starter cculturres in drry sausage production . Meat. Sc . 76 : 138-146.

-Ammor, M.S., Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, an update. *Meat science*,76 : 138-146.

-Arous, A. Ramnath, M., S. Gravesen, J. W. Hastings, and Y. Hechard. (2004). Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. Microbiology 150:2663–2668.

-Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 271-447.

Références Bibliographiques

-Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In:* Lactic acid bacteria. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Deccer. p. 1-72.

-Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. Y Cenatiempo, Jm Berjeaud, F Biet, C Fremaux, Y Hechard, D Robichon . Le Lait, INRA Editions, 1996, 76 (1 2), pp.169-177.

*bacteriology,Vol.2.(*P. H .A. Sneath., N. S. Mair., M. E. Shar& K. G. Holt, éds.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 1075-1079.

-Barefoot S.F. et Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 :1808- 1815.

-Bauer, R et Dicks, L. M. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol. Rev*. 101: 201-216.

-Blackburn, P Delves-Broughton, J.,., Evans, R.J. and Hugenhoitz, J. (1996). Applications of the bacteriocinnisin. *Ant. Van Leeuwenhock*. 69: 193-202.

-Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme K., Weissenbach, J., Ehrlich S. D et Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753.

-BOUIX M. et LEVEAU J. Y., (1988) : Les microflores responsables des transfonnations ; ln : techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA : le contrôle microbiologique. Vol. III, Tec. et Doc., Paris.

-Brul , S., Coote, P. 1999. Preservative agebts in foods : Mde of action and microbial resistance mechansms. Int.J. Food Microbiol. 50 : 1-17 .

-Buyukgungor, H. (1992). Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa carragenan gels. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 53, 173-175.

-Caplice, E., Fitzgeralddd, G. 1999. Food fermentatin : role microorganisms in fod production and preservation. Int. J . Food Microbiol. 50 : 1-2, 131-149.

-*C*enatiempo, Y Guyonnet, D., Fremaux, C.,. and Berjeaud, J.M. (2000) Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. Applied and Environmental Microbiology 66, 1744–1748.

-CHAFAI S. 2006 : Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet.

-Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and van der Donk, W. A. (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev*.*105*: 633-684.

Références Bibliographiques

-Chemlal kherraz Djazia, 2013 : Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia de Nil (Oreochromisniloticus) et mise e évidence de leur potentiel Probiotique, Université d'Oran.

-Chung, K. T., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. (1989) Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol.55*: 1329-1333.

-Collins, M. D., Williams, A. M. et Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of Aérococcus and Pediococcus as determined by 16sr RNA sequence analysis:description of *Tétragenococcus*, gen, nov., *EFMS. Microbiol., Lett.,* 70: 255-262.

-Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Ferusu, S. et Jones, D. (1987).Classification of *Lactobacillus divergens, Lactobacillus piscicola,* and some catalase negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus. *Carnobacterium. Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 310-316.

-De Vuyst, L et Vandamme. J.(1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis:* properties, biosynthesis, fermentation and application. 151-221 In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.), Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications. Blackie Académie and Professional. London, UK.

-Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. et Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.

Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D. 1994. *Caractéristiques générales In : bactéries lactique* (DeRoissard H. et Luquet F.M.).Lorica , Uriage. 1 : 25-116 .

-Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P.(2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Apl. Env. Microbiol.*, 76(2): 451-460.

-Deroissart, H. B. (1994). Les bactéries lactiques. *In*-Laits et produits laitiers, Vol. 3. (F. M. Luquet , éd.). *Technique et documentation Lavoisier, Paris*, pp. 343-407.

-Desmazeaud, M (1992). Les bactéries lactiques.*In*-Les groupes microbiens d'intêret laitier (Hermier, J., Lenoir, J & Weber, F, eds.).*C.E.P.I.L. Technique & Documentation. Lavoisier*.pp.9-60

-Dharam, P .,Narender, R. P. .2007.Indian traditional dairy products: an overview. International Conference on Traditional Dairy Foods. November 14-17. NDRI, KARNAL (INDIA).

-Diep , Ingolf F., Nes, Dzung B, et Holo H., (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus. Laboratory of Microbial Gene Technology, Department for Chemistry,*

Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, N1432 Ås, Norway. Vol4: 1198

-Dortu C. et Thoonart. 2009. Les bactéricines des bactéries lactiqes : CARACTéRISTIQUE s et interets pour la biocnservation des roduits alimentaires. Biotechnol. Agr . Soc . Envirn . 13 : 1, 143-154.

-El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* , 22: 509-516.

-Ennahar, S., Deschamps, N et Richard, J. (2000). Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 1-4.

-Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. and Nissen-Meyer, J. (2000) A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. Journal of Bacteriology 182, 2643–2648.

-Franzmann, P.D., Hôpfl, P., Weiss, N. et Tindall, B.J. (1991). Psychrotrophic, lactic acid producing bacteria from anoxia waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 156: 255- 262.

-Fréderiq P. (1948) Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.* 19: 1-17

-Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. *The scientific basis,* p1-8. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, London.

-Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., BenOmar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* , 120: 51-70.

-Garvie, E.I. (1986). Genus pediococcus. *In-Bergey's mannual of systematic*

-Giraffa, G. (2003). Functionality of Enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: p215–222.

-Gordin, BR et Gorbach, SL. (1992). Probiotics for humans. *The scientific basis*, p 355-376. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, Londres.

Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., Knochel, S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology,* 148 : 2361- 2369.

-Guarner, F., Perdigón, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L.

Références Bibliographiques

-Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C et Ross, R. P. (2006). Spontaneous résistance in *Lactoccocus lactis* IL1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett*. 260: 77-83.

-GUIRAUD J.P. (1998) : Microbiologie des principaux produits alimentaires ; in : «Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris.

-hair, Mémoire de magister en sciences vétérinaires. *Université El-hadj-*

*-H*allel A. (2001). Fromages traditionnels algériens. Quel avenir? *Revue Agroligne*., 14: p43-47.

-Hancock, R. E. (2000): Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.*9*:p 1723-1729.

Hassan A.N. et Frank J.F., 2001. Starter Culttures and their use. In : Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2Ed., *Marcel Dekker, Inc. New York*. *151-205*.

-Héchard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frère, J. (2001) Analysis of sigma(54)-dependent genes in Enterococcus faecalis : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147 : 1575-1580.

-Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. Pp 45-92.

-Holley, R.A., Guan, T.Y., Peirson, M. et Yost, C.K. (2002). *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1881-1885.

-Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D. et Leblond-Bourget N., (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435–463.

-Holt, J. G., Krieg, N. R ., Sneath, P. H. A, Stanley, J.T.et Williams, S.T. (1994). Group17, Gram-positive cocci: *In*-Bergeye's mannual of déterminative bacteriology, Vol.1 (P. H. A. Snaeth,N. S. Mair,M. E. Sharpe, & J. G.Holt,éd..), *Williams & Wilkins, Baltimore*, pp. 527-557.

-Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. et Schillinger, U (2000). Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutri*

-Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W et Hols, P.

-Kahina Maya Makhloufi. Caract´erisation d'une bact´eriocine produite par une bact´erie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolé´e du boza. Bact´eriologie. Universit´e Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Fran¸cais.

Références Bibliographiques

-Kandler, O et Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria: *In*bergey's mannual of systematic bacteriology.Vol.2.(P.H. A. Sneath., Mair, N., Scharpe, M. E., Holt. M. E., éd..).*Williams. & Wilkins ,Baltimore*, pp.1208-1260.

-Katikou, P., Ambrosiadis, L., Georgantelis, D., Koidis, P et Georgakis, S.A. (2007). Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets. *J. Sci. Food Agric*. 87: 477-484.

-Klaenhammer, T.R. (1993), Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*., 12(1-3): 39-85.

-Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Tarchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst
Lakhdar de Batna.

-*L*ansing M., Prescott, John P., Harley, Donald A. Klein, (2003). Microbiologie De Boeck Supérieur, P 549

-Leclerc, H., Deveriese, L.A et Mmssel, D.A.A. (1996). Txonomical changes in intestinal (faecal) *enterococci* and *streptococci*: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol*. 81: 459-466.

-Leyral, G., Vierling, E. 2001. Microbiologie et toxicologie des aliments .3éme édition Doin. France. P. 87-114.

-Liu S. 2003 Practical implication of lactate and pyruvate metablisme by lactic aciid bacteria in food and beverage fermentations Int. J. Food MICROBBBIOL 83 : 115-131.

-Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.

*M*ami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat‘s milk against *Staphylococcus aureus* . *World J. Dairy & Sci* ., 3: 39-49.

McKay, L.L et Baldwin, K.A. (1990).Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 87 : 3-14.

-Moroni, O (2007). Contribution à l’étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Lesteria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d’action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.146p. *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 2512-2517.

Références Bibliographiques

-*N*igutova K.,(2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol*., 102(2), 563-569.

-Nilsson, L., Gram, L et Huss, H.H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot*. 62: 336- 342.

-ORAMJ.D., REITERB., 1966. The inhibition of Streptococcus by lactoperoxydase, thiocyanate and hydrogen peroxide. II. The oxidation of thiocyanate and the nature of the inhibitory compound. Biochem. J., 100, 382-388.

-O'Sullivan, L., Ross, R.P et Hill, C. (2003). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 84: 593-604.

-Penaud, S. (2006). Analyse de la séquence génomique et Etude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 267p.

-Pot B. 2008.The taxonomy of lactic acid bacterie. In : Bactéries lactiques de génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec &Doc, Lavoidier. Paris.1-106.*

-Pridmore R.D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., Barretto C., Pittet A.C., Zwahlen M.C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T., Arigoni F et Schell M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium

-REITER B., 1978. Bacterial inhibitors in milk and other biological secretions, with special reference to the complement/ antibody, transferrin/lactoferrin, and lactoperoxidase/ thiocyanate/hydrogen peroxide systems. In :Streptococei, Skinner F.A., et Quesnel L.B., ed., Academie Press Inc., Londres, 31-60.

-Richard C., (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol*., 23(2), 175-183.

-Richard, C, Leroi, F., Brillet, A., Rachman, C, Connil, N., Drider, D., Pilet, M.F., Onno, B., Dousset, X. et Prévost, H. (2004). Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé: intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. *Lait*. 84: 135-144.

Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G., *Meat Science*. 80 (2008) 715-721.

-Ruoff, K. L. (2007). *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. L. Landry, J. H. Jorgensen & M. A. Pfaller (Eds.), 9th ed., pp. 443-454.

Références Bibliographiques

-Sakamot M., Tan Y., Uchimura T. KOmagata K. 1998. Aerbic growth of sme lactic acid bacteria enabled y the exterrnal f peroxidase (horseradish) to the culture meddium. J.Fermentation Bioengineering. 85 : 627-629.

-Savadogo, A. Traore, A.S.(2011).La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. Int. J. Biol. Chem. Sci. 5(5): 2057-2075, October 2011 .ISSN 1991-8631 p 2063-2064

-Scardovi, V.,(1986). Section 15. Irregular nonsporing. Gram-positive rods. Genus Bifidobacterium Orla- Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: p 1418-1434.

-Schleifer, K. H. et Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. System *Appl Microbiol* 18: 461-467.

Shah, N.P. ,(2000) : Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, , 83, 894-907.

-Simpson, W.J et Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* withnotes on the genera Tetragenococcus and Aerococcus. In the Genera of lactic acid bacteria; Wood BJB., Holzabef HW, Eds; Chapman & Hall, London, 125-172.

-Strus M., Gosiewski T., Kochan P., Heczko P.B.2006. The in vitro effect off hydgen pero xyde on vaginal micrbbial communities. FEMS Immonu. Medica Miccroiol. 48, 56-63.

-Tabak, S. (2007) : Interactions entre Helicobacter pylori responsable de maladies gastroduodénales et Bifidobacteries. Mémoire de magister, Université d'Oran.

-*T*agg, J.R. (2004) « Prevention of Streptococcal Pharyngitis by Anti-*Streptococcus pyogenes* Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Produced by *Streptococcus salivarius* »,*Indian J Med Res,* vol. 119, , p. 13-16.

-Twomey D., Ryan M., Meaney B. & Hill C., (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.

-Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J et Gibbs, P. (2005). Growth control of *Listeriainnocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by*Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control.* 16: 541-549.

-Vela, A.I., Garcia, N., Latre, M.V., Casamayor, A., Sanchez-porro, C., Briones, V.,

-Ventosa, A., Dominguez, L et Fernandez –garayzabal, J.F. (2007). *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 1291-1294.

-Vollenweider, S. 2004. 3-HYDROXYPRPIONALDEHYDE : applications and perrspectties oof botechnological. Appl. MIicrobiol. Biotech. 64 : 16-27.

Références Bibliographiques

-Wallbanks, S., Martinez.Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., and Collins, M.D., (1990) - 16S rRNA sequence determination for members of the genus Carnobacterium and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. *40*, 224-230.

-WALSTRA, P. The milk fat globule naturaland synthetic, XX international dairy congress paris,

-Walter J., Hertel, C., Tannock, GW., Lis, C.M., Munro, K et Hammes, W.P (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 : 2578-2585.

-Yanez, R., J.L. Alonso et J.C. Parajo (2005). D(-)-lactic production from waste carboard. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 76-84.

-Yoo, I.K, H.N. Chang, E.G. Lee, Y.K. Chang et S.H. Moon (1997). By-product formation in cell-recycled continuous culture of Lactobacillus casei. Biotechnology Letters, 19, 237-240.

-Zalan Z., Barath A., 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of lactobacillus strains. Food Technol. Biotech. 43 : 21-225.

Annexe

Annexe

1. Annexe 1

Verrerie	appareils	produits chimique
Erlenmeyer	Autoclave	NaCl
Bicher	Etuve bactériologique	Eau distillé
Eprouvette	Balance de précision	Eau physiologique
Fiole	Microscope optique	Peptone
Pipette graduée	Loupe binoculaire	Glucose
Poire	Plaque chauffante	Agar
Pipette pasteur	Micropipette 100 µl	Extrait de levure
Boite de pétri	Centrifugeuse	Rouge de méthylène
		α -naphtol
		Sulfate de magnésium
		Chlorure de sodium
		Citrate de sodium
		Bleu de bromothemol
		Bleu de méthylène
		H_2O_2
		Ethanol
		Huile de vaseline
		Phénol
		Acide sulfurique
		fuchsine
		lugol
		violet de gentiane

2. Annexe 2 :

2.1. Préparation de dilutions décimales :

Un millilitre de la dilution mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une micropipette et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant et ainsi de suite jusqu'à 10^{-6} (Guiraud., 2003). Au moment de la réalisation des dilutions décimales, il est impératif de changer de pipettes entre chaque dilution.

2.2. Préparation du jus de datte

Les dattes sont d'abord lavées puis dénoyautées. L'eau est rajoutée à raison de 2 litres par kilogramme de pulpe de datte. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 heures. Le jus obtenu est centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulosiques. Le surnageant recueilli est utilisé en tant que source de carbone avant d'être dilué aux proportions convenables.

3. Annexe 3

3.1. Composition des Solutions de titrage

Solution de NaOH 0,02N :

Eau distillé	500 ml
NaOH	0.4g

Solution de $KMnO_4$ 0,02N :

Eau distillé	500 ml
$KMnO_4$	1.58g

4. Annexe 4

4.1. Réactifs et disques :

- H2O2 : pour la recherche de la présence de catalase.
- Disque OX (Oxydase) : pour la mise en évidence du cytochrome oxydase.
- Disque ONPG : pour la mise en évidence de la β-galactosidase.
- α-naftol : pour la mise en évidence présence d'acétoïne
- Bleu de méthylène : la mise en évidence, de la fermentation acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

5. Annexe 5

5.1. Coloration de gram (Singleton, 1999).

Mode opératoire :

- Un frottis fixé a la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane ;
- Il est ensuite rincé rapidement a l'eau courante ;
- Traité pendant une minute par la solution de lugol ;
- Le frottis est de nouveau rincé rapidement ;
- Après le traitement avec l'éthanol (95°), la lame est maintenue inclinée : on fait couler le solvant sur le frottis pendant une a trois secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis ;
- Rincer a l'eau courante ;
- Faites une contre colorant de 30 secondes a la Fuchine basique diluée ;
- Rincer brièvement et sécher le frottis au buvard ;
- Examiner a l'objectif a immersion (grossissement X 100 dans notre cas) ;
    - Les cellules à gram positif sont en violet.
    - Les cellules à gram négatif sont roses.

Annexe

5.2. La composition des colorants utilisés

A. Violet de gentiane au cristal

Violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	100 cm^3
Eau distillée	1 dm^3

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est ajoutée ensuite.

B. Lugol

Iode	5g
IO dure de potassium	10g
Eau distillée qsp	1g

C. Fuchsine de Ziehl

Fuchsine basique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.5	10cm^3
Eau distillée	1dm^3

6. Annexe 6

6.1. Composition des milieux de culture solide

6.1.1. Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH_2PO_4	2g
$MgSO_4$	0.1g
$MnSO_4$	0.05g
Agar	12g
Tween80	1ml
Eau distillée q.s.p	1000ml

PH=6.5 ± 0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min.

6.1.2. Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

PH 6,8

6.1.3. Gélose- Glucose – Lactose –Saccharose – H2S(Ou milieu TSI)

Extrait de viande de bœuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0, 3 g
Lactose	10 g
Glucose	1g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,05 g
Agar	12 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

6.1.4. TSA (Gélose)

Hydrolysat enzymatique de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar A	12g
Eau distillée	1000ml

Ph 7.3±0.2

6.1.5. Gélose moelle (TSB+ 0.75%Agar)

Hydrolysat enzymatique de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar A	12g
Eau distillée	1000ml

6.1.6. Milieu Gélose nutritif (GN)

Tryptone	5g
Extrait de viande	3g
Agar agar bactériologique	12g
Eau distillée	1000ml

6.1.7. Milieu Möeller :

Peptone pepsique de viande	5g
Extrait de viande	3g
Pourpre de bromocresol	12g
Rouge de cresol	0.005g
Glucose	0.5g
pyridoxal	0.005g
Eau distillée	1000ml

pH= 6 On ajout a chaque tube de milieu de base stérile 1 ml d'acide aminé (Arginine, lysine, ornithine) a 10% stérilisé par filtration.

6.2. Milieux liquides

6.2.1. Eau physiologie

NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

6.2.2. Bouillon MRS

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g

pH = 6.2

6.2.3. Urée –Indole

L-tryptophane	3g
KH2PO4	1g
K2PO4	1g
NaCl	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Rouge de phénol à 1%	2,5ml
Eau distillée q.s.p	1000ml

6.2.4. Mannitol-mobilité

Peptone trypsique de viande	20 g
Agar	4g
Mannitol	2g
KNO3	1g
Rouge de phénol à 1 %	4ml
Eau distillée q.s.p	1000 ml

pH=7.6-7.8

6.2.5. Milieu de Möeller

Peptone pepsique de viande	5g
Extrait de viande	5g
Pourpre de bromocresol	0 ,01g
Rouge de cresol	0,05g
Glucose	0,50g
Pyridoxal	0,005g
Eau distillée	1000ml

pH =6. On ajoute à chaque tube de milieu de base stérile 1ml D'acide aminé (arginine, lysine, ornithine) à 10% stérilisé par filtration.

6.2.6. Bouillon Clarck et Lubs

Tryptone	2g
Peptone bactériologique	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g

Dissoudre 17 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,4

7. Annexe 7

7.1. Composition du lait de sherman

Lait écrémé stérile en tubes	9ml
Bleu de méthyléne a 1% stérilisé 20 minute a 120 °C	1ml
Bleu de méthyléne a 3% stérilisé 20 minute a 120 °C	3ml

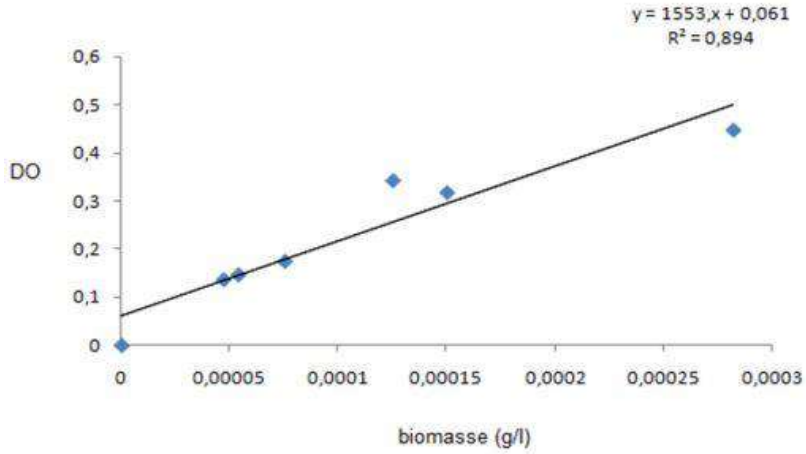
7.2. Composition de lait écrémé

Lait écrémé en poudre	100g
Eau distillé	100ml

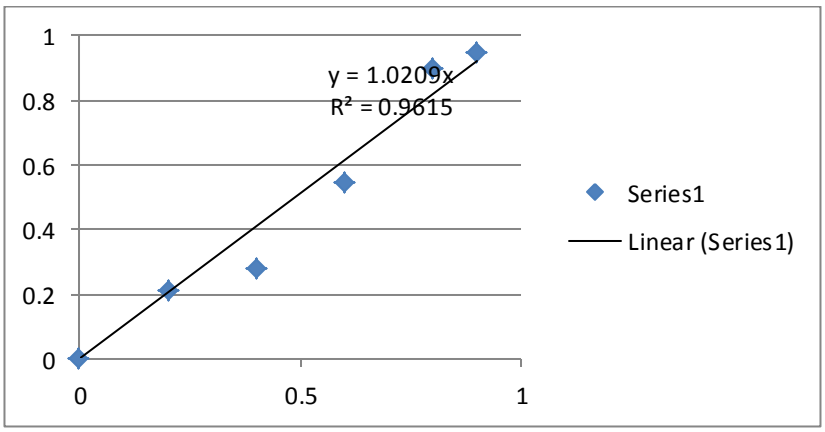
Autoclaver a 110 °C pendant 10 min.

8. Annexe 8

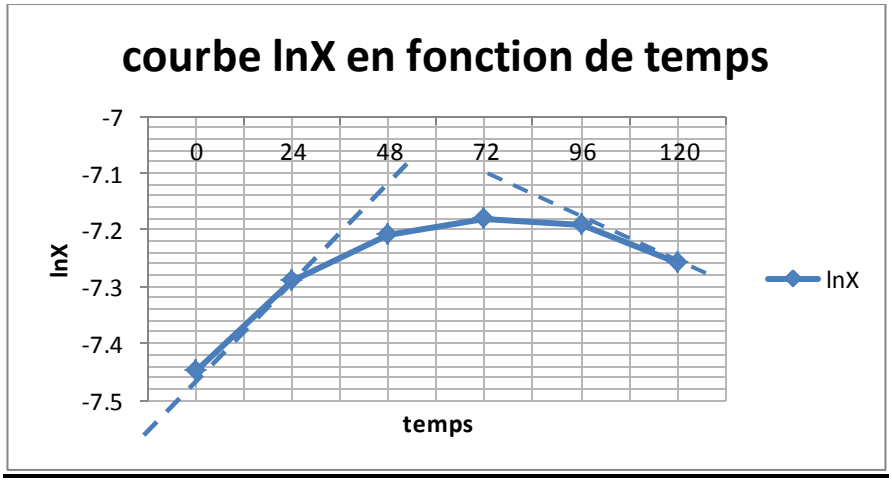
8.1. Courbe d'étalonnage de la biomasse :



8.2. Courbe d'étalonnage des sucres :



8.3. Courbe d'évolution du logarithme népérien de la concentration en biomasse au cours de la fermentation discontinue.



Autorisé d'après l'université YAHIA FARES, MEDEA, 2017.