

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat
En MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié

Présentée par : KASSAS Zohra

Directrice de thèse : M^{me}. DJEGHRI- HOCINE
Baida

Professeur : Ecole nationale supérieure
des sciences de la mer et de la protection
du littoral- Alger

Membre de jury :

Présidente : M^{me}. CHETTIBI Houria

Professeur : Universié d'Annaba

Examinatrices : M^{me}. GRARA Noudjoud

MCA : Universié de Guelma

M^{me}. BERREDJEM Hajira

MCA : Universié d'Annaba

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

Je remercie en premier lieu le **Créateur** des cieux et des terres, notre **Grand Dieu** Tout Puissant qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'affronter les difficultés rencontrées et aboutir à la réalisation de ce travail.

Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse **Mme Djeghri Hocine Baida**, professeur à l'école nationale supérieure des sciences de la mer et de la protection du littoral-Alger, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir permis de travailler sur un projet où j'ai pu me familiariser avec différentes techniques de microbiologie et de biochimie. Et delà de sa compréhension, j'ai beaucoup apprécié la confiance qu'elle m'a toujours accordée, et grâce à laquelle j'ai bénéficié d'une grande liberté dans mon travail.

J'adresse également mes remerciements à mes anciens professeurs : **Mme CHETTIBI Houria**, Professeur à l'université Badji Mokhtar- Annaba qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Je remercie **Mme BERREDJEM Hajira**, Maître de conférences classe A à l'université Badji Mokhtar-Annaba d'avoir bien voulu me faire le grand honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Mme GRARA Noudjoud**, Maître de conférence classe A à l'université de Guelma pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, d'examiner ce travail et d'avoir fait le déplacement.

Une pensée particulière pour mes « soeurs » du labo 36 : Aicha, Imène, Kaltoum, Saida, Samia, Zineb et Marwa. Nos longues discussions sur le labo, la vie et le reste me manquent déjà... N'oubliez jamais que vous êtes toutes exceptionnelles.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail à commencer par le directeur de laboratoire de biochimie et microbiologie appliquée Professeur Ladjama Ali et les enseignants qui ont contribué à ma formation. Nos techniciens et technicienne du

département de biochimie surtout Mme Saida et Mr Lashar. Je remercie infiniment mon oncle Bachir et « Ami Cherif» pour leur aide.

Et enfin, le plus grand des mercis à mes parents de m'avoir permis de réaliser mon rêve. J'espère que vous êtes fiers de moi. Merci tout simplement d'être mes parents. A ma moitié, pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin et pour avoir su comprendre les concessions et les sacrifices. Ton soutien, ta patience, ta compréhension et le réconfort que tu m'as apporté auront été irréprochables. Cette thèse est aussi la tienne.

Dédicace

Je dédie cet événement marquant de ma vie :

*A mes chers **parents**, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que Dieu les bénisse. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours pour vous. Merci pour vous être sacrifiée pour que vos enfants grandissent et prospèrent.*

*A mon **mari** Nouredine , ton soutien moral et materiel m'ont permis de réussir mes études.*

*A ma **grande mère** : à celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur, que Dieu te protège et te prête bonne santé et longue vie.*

*A mes chères **sœurs** et mes chers **frères** : Seif, Mohammed et Adam.*

*A mes adorables **nièces** et **neveux** qui illuminent mes journées en toutes circonstances.*

*A ma **belle famille**.*

*A mes **tantes** et **oncles** surtout **Rezak** : je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.*

*A tous **ceux** que j'aime.*

Zohra

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : les bactéries lactiques 3

I-1- Généralités	3
I-2-Taxonomie et classification des bactéries lactiques	3
I-3- Le genre <i>Lactobacillus</i>	7
I-4- Besoins nutritionnels des bactéries lactiques	10
I-4-1- Exigences en acides aminés	10
I-4-2- Exigences en vitamines	11
I-4-3- Exigence en bases azotés	12
I-4-4- Influence des cations	13
I-5- Métabolisme des bactéries lactiques	13
I-5-1- Métabolisme carboné des bactéries lactiques	13
I-5-2- Métabolisme azoté des bactéries lactiques	16
I-5-3- Métabolisme lipidique	18
I-5-4- Métabolisme de citrate	18
I-6- Applications des bactéries lactiques	20
I-6-1- Culture starter	20
I-6-2- Biopréservation des aliments	20
I-6-3- Rôle technologique	21
I-6-4- Rôle probiotique	21
I-7- Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques	23
I-7-1- Le milieu de culture	23
I-7-2- La température	23
I-7-3- Le pH	24
I-7-4- Le potentiel redox	26

Chapitre II : Les milieux de culture des bactéries lactiques 27

II -1-Définition d'un milieu de culture	27
II-2- Composition des milieux de culture	27
II-2-1- Les peptones	27
II-2-2- l' extrait de levure	28
II-2-3 - l'extrait de viande	28
II- 3- Milieux de culture des bactéries lactiques	28
II- 3-1- Milieux industriels	28

II- 3-2- Milieux usuels utilisés au laboratoire	29
a- Le milieu Elliker	30
b- Les milieux spécifiques aux lactobacilles	31
c- Les milieux spécifiques aux lactocoques et aux streptocoques	31
Chapitre III : Le pois, la figue sèche et la caroube : des substrats végétaux locaux	33
III-1-le pois	33
III-1-1- Généralités	33
III-1-2- Exigences écologiques et climatiques de la plante	33
III-1-3- Morphologie de la plante	34
III-1-4- Le pois cassé	34
III-1-5- Production	34
III-1-6- Composition	35
III-2- La figue sèche	36
III-2-1- Caractéristiques générales	36
III-2-2- Description botanique	36
III-2-3- Composition	36
III-2-4- Exigences climatiques et écologiques	37
III-2-5- Reproduction	37
III-2-6- Production	38
III-2-7- La méthode de séchage des figues	38
III-3- la Caroube	38
III-3-1- Classification	38
III-3-2- Historique	39
III-3-3- Ecologie	39
III-3-4- Description botanique	39
III-3-5- Propriétés	40
III-3-6- Utilisation	40
CHAPITRE IV : Les modèles expérimentaux	41
IV-1- Le modèle conventionnel	41
IV-2- Les plans d'expériences	41
IV- 2-1- Plans factoriel complets à deux niveaux	43
IV-2-2- Plans factoriels fractionnaire	43
Partie II : Matériel et méthodes	
I-Matériel	45
II- Méthodes	46
II-1 - Revivification et contrôles de la pureté des souches	46
II- 2- Préparation des milieux de culture	47
II-2-1- MRS végétal	47
II-2-2-Préparation des jus des substrats végétaux	48
II-3- Méthodes analytiques	48
II-3-1- Détermination de la matière sèche	49
II-3-2- Détermination des cendres	49

II-3-4-Dosage des sels minéraux	49
II-3-5-Détermination des sucres totaux	49
II-3-6-Détermination des protéines	50
II-4- Sélection de milieu de base	50
II-5-Mise en culture et estimation de la croissance	52
II-6-Méthode d'optimisation	53
II-7-Croissance sur les milieux optimisés et le milieu MRS végétal	60
II-8-Cinétique de croissance	60

Partie III : Résultats

I-Composition des jus végétaux	61
II- Sélection de substrat de base	63
III-Optimisation	64
III-1- <i>Lb plantarum</i>	64
III-2- <i>Lb brevis</i>	73
III-3- <i>Lb rhamnosus</i>	79
III-4- <i>Lb fariminis</i>	86
III-5- <i>Lb fermentum</i>	91
IV-Validation des modèles	98
V- Croissance sur les milieux optimisés et le milieu MRS végétal	100
VI- Cinétique de croissance	101

Partie IV : Discussion 105

Conclusion générale et perspectives 114

Références bibliographiques 116

Annexes

Résumés

Article

Liste des abréviations

ACK : Acétate kinase

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

BL: Bactéries lactiques

BSA : Bovin Serum Albumin

F : *Ficus*

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

GRAS: Generally Regarded As Safe

H : Humidité

JC : Préparation de jus de caroube

JFS : Préparation de jus de figue sèche

JPC : Jus de pois cassé

P : *Pisium*

Lb: *lactobacillus*

Lc : *lactococcus*

Leuc : *Leuconostoc*

MCD : Milieu chimiquement défini

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

MS : Matière Sèche

NADH, H⁺ : Nicotinamide adénosine (forme réduite)

ND : Non déterminé

rpm : Rotation par minute

SL : Selective medium

ssp : Sous-espèce

St : *Streptococcus*

UFC : Unité formant colonie

WHO : World health organization

XPC : Xylulose-6-phosphate phosphocétolase

Liste des figures

Figures présentées dans la partie Synthèse bibliographique

Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et genres apparentés	7
Figure 2 : Arbre phylogénétique des principaux groupes du genre <i>Lactobacillus</i> basé sur les séquences des ARNr 16S	8
Figure 3 : Voie homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose	15
Figure 4 : Métabolisme du pyruvate	16
Figure 5 : Système perméase	17
Figure 6 : Principales étapes du métabolisme du citrate chez les BL	19
Figure 7 : Caractéristiques des souches probiotiques	22
Figure 8 : Production du pois en Algérie	35
Figure 9 : Centres d'origine et distribution du caroubier dans le monde	39
Figure 10 : Points expérimentaux disposés dans un domaine expérimental	42

Figures présentées dans la partie Résultats

Figure 11 : Croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 dans la première série des milieux	62
Figure 12 : Croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 dans la deuxième série des milieux	62
Figure 13 : Diagramme de Pareto pour la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14	65
Figure 14a : Surface de réponses de la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 en fonction de glucose et lactulose	70
Figure 14b : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 en fonction de glucose et MgSO ₄	70
Figure 14c : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 en fonction de MgSO ₄ et lactulose	71
Figure 15 : Les optima des facteurs sélectionnés pour <i>Lb plantarum</i> BH14	72
Figure 16 : Diagramme de Pareto pour la croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27	74
Figure 17 : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27 en fonction de K ₂ HPO ₄ et acétate de sodium	78
Figure 18 : Les optima des facteurs sélectionnés pour <i>Lb brevis</i> CHTD27	78

Figure 19 : Diagramme de Pareto pour la croissance de <i>Lb rhamnosus</i>	80
Figure 20 a : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb rhamnosus</i> en fonction du MgSO ₄ et acétate de sodium	83
Figure 20b : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb rhamnosus</i> en fonction du taux d'inoculation et acétate de sodium	84
Figure 20c : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb rhamnosus</i> en fonction du MgSO ₄ et taux d'inoculation	84
Figure 21 : Les optima des facteurs sélectionnés pour <i>Lb rhamnosus</i>	85
Figure 22 : Diagramme de Pareto pour la croissance de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	87
Figure 23 : Surface de réponse de la croissance d <i>Lb farciminis</i> DSM 20184 en fonction du taux d'inoculation et du pH	90
Figure 24 : Les optima des facteurs sélectionnés pour <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	90
Figure 25 : Diagramme de Pareto pour la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	92
Figure 26a : Surface de réponse de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049 en fonction du pH et tween80	95
Figure 26b : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049 en fonction du pH et MgSO ₄	96
Figure 26c : Surface de réponse de la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049 en fonction du MgSO ₄ et tween 80	96
Figure 27 : Les optima des facteurs sélectionnés pour <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	97
Figure 28 : Croissance des lactobacilles sur leurs milieux optimisés et le milieu MRS végétal	99
Figure 29 : Cinétique de croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 sur le milieu optimisé	102
Figure 30 : Cinétique de croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27 sur le milieu optimisé	102
Figure 31 : Cinétique de croissance de <i>Lb rhamnosus</i> sur le milieu optimisé	103
Figure 32 : Cinétique de croissance de <i>Lb farciminis</i> DSM 20049 sur le milieu optimisé	103
Figure 33 : Cinétique de croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20184 sur le milieu optimisé	104

Liste des tableaux

Tableaux présentés dans la partie synthèse bibliographique

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	6
Tableau 2 : Habitats des lactobacilles	9
Tableau 3: Besoins en acides aminés des lactobacilles	11
Tableau 4 : Correspondance entre certaines vitamines, coenzymes, et réactions métaboliques chez les bactéries lactiques	12
Tableau 5 : Systèmes de transports d'acides aminés identifiés chez les bactéries lactiques	17
Tableau 6 : Températures optimales de croissance des bactéries lactiques	24
Tableau 7 : pH optimal pour la croissance des bactéries lactiques et probiotiques	25
Tableau 8: Milieux de références les plus employés pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques	30
Tableau 9 : Composition chimique du pois	35
Tableau 10 : Composition des figues sèches	37
Tableau 11 : Générateur des matrices selon Plackett et Burman	44

Tableaux présentés dans la partie matériels et méthodes

Tableau 12 : Composition du MRS végétal	47
Tableau 13 : Milieux testés de la série 1	51
Tableau 14 : Milieux testés de la série 2	51
Tableau 15: Les variables utilisés dans le modèle de Plackett-Burman ainsi que leurs niveaux	54
Tableau 16: Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 combinaisons	55
Tableau 17: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de <i>Lb plantarum</i> BH14	57
Tableau 18: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de <i>Lb brevis</i> CHTD27	57
Tableau 19: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de <i>Lb rhamnosus</i>	58

Tableau 20: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	58
Tableau 21: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	59

Tableaux présentés dans la partie Résultats

Tableau 22 : Composition des jus végétaux préparés	61
Tableau 23 : Composition en sels minéraux	61
Tableau 24 : Résultats de la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 selon le plan de Plackett-Burman	64
Tableau 25 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14	65
Tableau 26: Résultats de la croissance de <i>Lb plantarum</i> BH14 selon le plan de Box et Wilson	67
Tableau 27 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lb plantarum</i> BH14	67
Tableau 28: Analyse de variance pour <i>Lb plantarum</i> BH14	68
Tableau 29 : Résultats de la croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27 selon le plan de Plackett Burman	73
Tableau 30 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27	74
Tableau 31: Résultats de la croissance de <i>Lb brevis</i> CHTD27 selon le plan de Box et Wilson	75
Tableau 32 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lb brevis</i> CHTD27	76
Tableau 33 : Analyse de variance pour <i>Lb brevis</i> CHTD27	77
Tableau 34: Résultats de la croissance de <i>Lb rhamnosus</i> selon le plan de Plackett-Burman	79
Tableau 35 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb rhamnosus</i>	80
Tableau 36 : Résultats de la croissance de <i>Lb rhamnosus</i> selon le plan de Box et Wilson	81
Tableau 37: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lb rhamnosus</i>	82
Tableau 38 : Analyse de variance pour <i>Lb rhamnosus</i>	83

Tableau 39 : Résultats de la croissance de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184 selon le plan de Plackett-Burman	86
Tableau 40 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	87
Tableau 41 : Résultats de la croissance de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184 selon le plan de Box et Wilson	88
Tableau 42 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	89
Tableau 43 : Analyse de variance pour <i>Lb farciminis</i> DSM 20184	89
Tableau 44 : Résultats de la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM20049 selon le plan de Plackett-Burman	91
Tableau 45 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	92
Tableau 46 : Résultats de la croissance de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049 selon le plan de Box et Wilson	93
Tableau 47 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	94
Tableau 48 : Analyse de variance pour <i>Lb fermentum</i> DSM 20049	95

Introduction

Les aliments, les micro-organismes et l'être humain ont vécu une longue et intéressante association, qui s'est développée bien avant l'histoire écrite. Depuis les années 1900, la production d'aliments fermentés et par conséquent la demande de cultures starter de bactéries lactiques (BL) a été largement accrue. Une attention à la relation entre l'alimentation et la santé a augmenté et par conséquent le marché des aliments fonctionnels a montré une croissance remarquable au cours des dernières années. Pourtant, les additifs alimentaires sont nécessaires pour la conservation des produits alimentaires et l'amélioration des propriétés organoleptiques, leur utilisation présente un certains danger. Ceci a conduit à l'utilisation des BL capables de produire des substances antimicrobiennes, des polymères de sucre, des édulcorants, des composés aromatiques, des enzymes utiles, ou nutraceutiques, ou des BL avec des propriétés favorisant la santé, appelées souches probiotiques afin de remplacer les additifs chimiques par des composés naturels, en même temps, fournir au consommateur de nouveaux produits alimentaires (Leroy et De Vuyst, 2004).

Les BL est un groupe de bactéries à Gram positif, produisent de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Elles possèdent en effet un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité. Elles sont très ubiquistes qui depuis longtemps se sont avérées utiles à l'homme. Leur nom est en lui-même évocateur de leur caractéristique principale : la production de l'acide lactique à partir d'une source de carbone.

Les applications des BL et surtout des lactobacilles augmentent sans cesse au fil du temps. Elles sont utilisées dans les industries laitières, alimentaires et pharmaceutiques, dans l'alimentation des animaux et la biopréservation des aliments vue leurs caractéristiques : amélioration de la texture, production des acides organiques et des bactériocines et leurs effets probiotiques (Soomro et *al.*, 2002).

Plusieurs études rapportées dans la littérature ont été menées pour trouver des milieux de culture moins coûteux et fiables pour la croissance des lactobacilles (Lechiancole et *al.*, 2002 ; Hom et *al.*, 2005 ; Cochu et *al.*, 2008 ; Vazquez et *al.*, 2008 ; Wegkamp et *al.*, 2009 ; Tomas et *al.*, 2010 ; Aguirre-Ezkauriatza et *al.*, 2010 ; Krzywonos et *al.*, 2011 ; Hanoune et *al.*, 2015 ; Ahmed-Gaid et *al.*, 2016).

Leur croissance nécessite des milieux de culture riches et complexes à base d'extrait de levure ou de viande et des peptones animales (Ashref et Shah, 2011) vue leurs exigences polyauxotrophiques élevées au divers acides aminés, des peptides, des nucléotides, des vitamines et des acides gras en raison de leur capacité biosynthétique limitée (Desmazeaud, 1983 ; Fitzpatrick et Keeffe, 2000).

Le milieu MRS (DeMan et *al.*, 1960) est couramment utilisé pour la croissance des BL. C'est un milieu très riche : un mélange de différentes sources de carbone (acétate, citrate, hydrates de carbone) et des sources d'azote complexes (Calderon et *al.*, 2001). L'inconvénient majeur de ce milieu c'est qu'il comprend des composants trop coûteux pour des applications industrielles (Krzywonos et Eberhard, 2011). Un autre inconvénient du MRS concerne la présence de constituants d'origine bovine, qui devrait être évité dans la production alimentaire en raison des risques liés à l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine (Horn et *al.*, 2005).

Afin de choisir un milieu de culture approprié, différents aspects doivent être pris en considération: le coût, la capacité d'atteindre un nombre élevé de cellules (Georgieva et *al.*, 2009). En raison de leurs exigences aux facteurs de croissance et leur sensibilité aux inhibiteurs, la formulation des milieux de culture sélectifs est difficile (Djeghri et *al.*, 2010). De nombreuses supplémentations animales ont été testés tels que: les peptones des cornes des béliers (Kurbanoglu, 2004), jaune d'œuf délipidé (Djeghri et *al.*, 2007b), l'hydrolysats des viscères des poisson (Vázquez et *al.*, 2008) et des supplémentations d'origine végétales tel que : les céréales (Charalampopoulos et *al.*, 2002), les extraits de pomme de terre (Gaudreau et *al.*, 2002), des extraits de févrole (Djeghri et *al.*, 2006), les mélasses (Coelho et *al.*, 2010). Les extraits de plantes sont généralement plus économiques que les extraits de viande ce qui explique leurs utilisation croissante dans les milieux de culture des BL.

Le développement d'un milieu de culture économique nécessite la sélection de source d'azote, de carbone, de phosphore ainsi que les éléments minéraux. Les exigences nutritionnelles ainsi que les conditions de culture peuvent être déterminés par la méthode conventionnelle (classique) ou la méthode statistique. Cette dernière offre plusieurs avantages: elle est rapide, fiable et permet de réduire le nombre d'expériences. Elle a été utilisée dans de nombreux procédés d'optimisation de la fermentation (Lechiancole et *al.*, 2002 ; Altaf et *al.*, 2005 ; Naveena et *al.*, 2005 ; Coelho et *al.*, 2011). L'approche expérimentale classique pour l'optimisation des milieux de culture impliquent le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables, elle est longue ; nécessite un grand

nombre d'expériences. Un autre inconvénient caractérise cet approche ; elle ne prend pas en compte les interactions entre les variables ce qui rend la détermination des optima impossible alors que l'approche statistique peut déterminer l'effet des variables et leur interaction avec un nombre limité d'essais (Belmessikh et *al.*, 2013).

Les objectifs de cette étude sont les suivants:

- ✓ La valorisation des produits locaux : pois cassé, figue sèche et caroube comme milieux de culture pour cinq souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*.
- ✓ L'élaboration d'un milieu de culture à base de ces substrats végétaux pour la croissance des lactobacilles fiable et économique sans l'addition des composés coûteux du MRS tel que les peptones, l'extrait de viande et de levure.
- ✓ L'optimisation de la composition chimique des milieux formulés ainsi que les conditions de croissance en appliquant l'approche statistique.



Synthèse bibliographique

Chapitre I : les bactéries lactiques

I-1- Généralités :

Les BL sont de très anciens microorganismes dont les ancêtres ont pu voir le jour il y a trois milliards d'années. A la fin du 19^e siècle Robert Koch eu des retombées sur la connaissance, le rôle et l'utilisation des BL (Chamba, 2009). Donc, le concept des BL comme un groupe d'organismes mis au point au début des 1900, précédée d'avant-garde scientifique et développements techniques au cours de la dernière partie du 19^{ème} siècle (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les BL regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides. La fermentation est dite : homolactique, si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique, si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc) (Larpent, 1996).

Elles sont donc des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes. Elles sont des cocci, des bacilles ou des coccobacilles ayant un contenu d'ADN en G+C inférieur à 50%. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni oxydase.

Les BL sont très fréquentes dans la nature. Elles sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées, des produits laitiers, de la viande, des fruits en décomposition, du poisson fermenté, des eaux usées et des cavités (buccale, les organes génitaux, les voies intestinales et respiratoires) des humains et des animaux (König et Fröhlich, 2009).

I-2-Taxonomie et classification des bactéries lactiques

L'approche classique de la taxonomie bactérienne est fondée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques auxquelles s'est ajoutée la composition de la paroi; les acides gras (Alexandre et *al.*, 2008). La première classification des BL a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (Stiles et Holzapfel, 1997). Mais les caractéristiques moléculaires comme le pourcentage de G+C de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence des ARNr, sont devenus des outils taxonomiques importants. Ces outils ont conduit à des changements notables dans la classification des BL (Alexandre et *al.*, 2008).

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des BL est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté

énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre. A ce groupe de BL, appartient plusieurs genres (Tableau 1) comme *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Pot, 2008). Le genre *Bifidobacterium*, souvent considéré dans le même contexte que les BL car il partage certaines de leurs caractéristiques typiques bien qu'il dispose d'un mode unique de fermentation des sucres et il se distingue par un pourcentage G+C de 55% (Axelsson, 2004).

Elles appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity et al., 2004).

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* ont été classé en un seul genre *Streptococcus*, et sont phylogénétiquement proches. La seule espèce utilisée en industrie alimentaire est *S thermophilus* en association avec *Lb delbrückii subsp bulgaricus* dans la fabrication du yaourt, elle est utilisée aussi pour la production de certains types de fromages. *Lactococcus lactis* est actuellement la seule espèce utilisée en industrie laitière. Elle se subdivise en trois sous espèces : *Lc lactis* subsp. *lactis*, *Lc lactis* subsp. *cremoris* et *Lc lactis* ssp. *hordniae*. Tandis que, *Enterococcus* n'a pas d'importance en industrie alimentaire (Axelsson, 2004). Parmi les genres des BL les plus isolés à partir des plantes, le genre *Leuconostoc* est principalement l'espèce *Leuc. mesenteroides*. Cette dernière est largement utilisée dans la fermentation des aliments à base des végétaux vue sa résistance a l'acidité (Stiles et Holzappel, 1997). Les bactéries de ce genre sont des coques, produisent D- acide lactique à partir du glucose et elles se caractérisent par un métabolisme hétérofermentaire (Axelsson, 2004).

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques (Von Wrighe et Axelsson , 2012)

famille	genre	forme	CO2 à partir du glucose	croissance à 10°	croissance à 45°	croissance à 6,5% Nacl	croissance à 18% Nacl	croissance à pH 4,4	croissance à pH 9,6	acide lactique
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	cocci	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobactereaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	bâtonnet	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	cocci		+	-	+	+	variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	cocci		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	batonnet	variable	variable	variable	variable	-	variable	-	D,L,DL
	<i>Pediococcus</i>	cocci	-	variable	variable	variable	-	+	-	L,DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	cocci	+	+	-	variable	-	variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	variable	-	variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	variable	-	variable	-	D,DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	cocci	-	+	-	-	-	variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	variable	-	-	-	-	L

ND : non déterminé

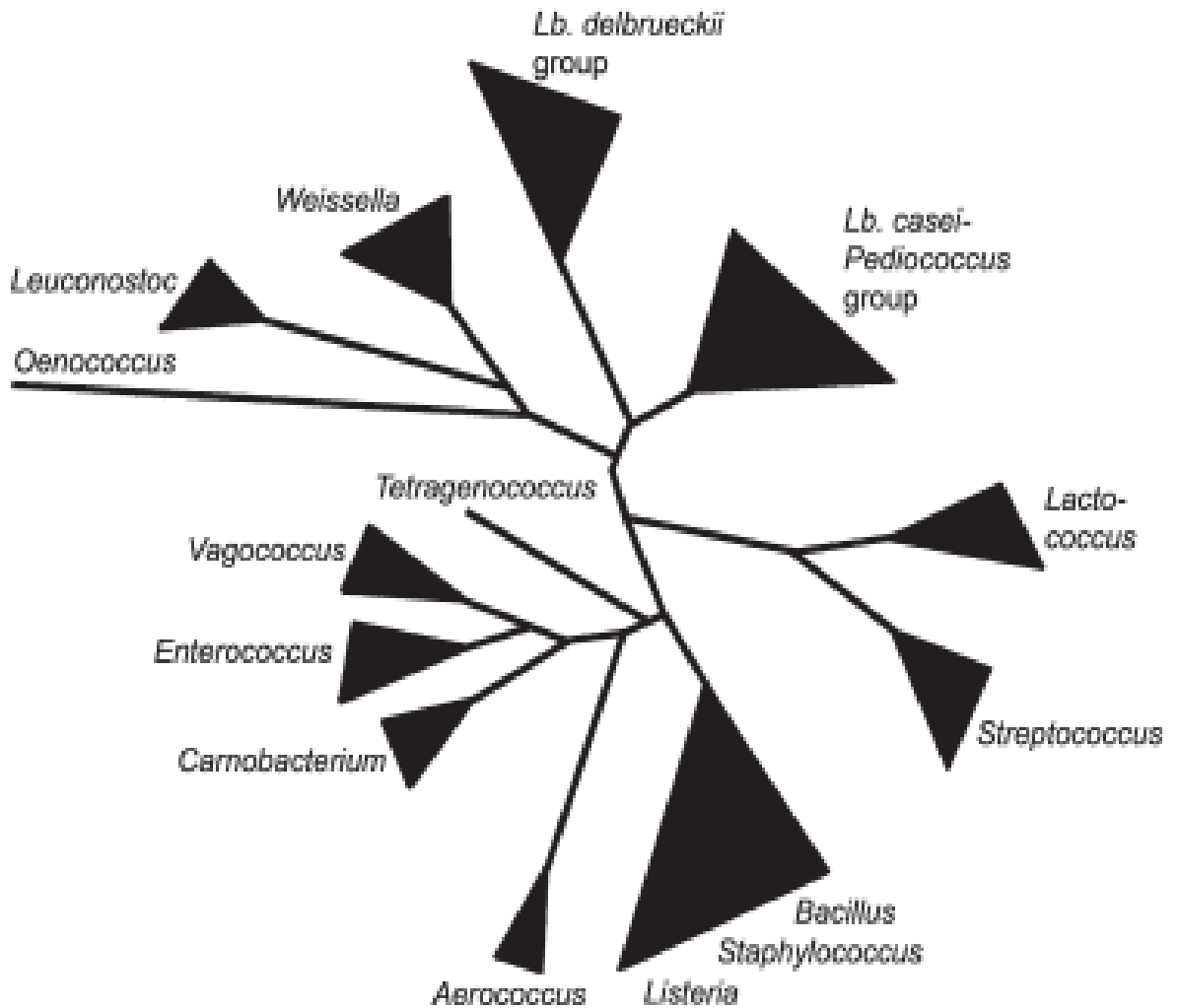


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et genres apparentés (Axelsson, 2004)

I-3- Le genre *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre le plus utilisé en industrie alimentaire et la nutrition humaine en raison de leur rôle dans la fermentation et la préservation des aliments ainsi que leur rôle probiotique. Les lactobacilles contribuent à la saveur des aliments fermentés par la production de diacetyl et des amines. Ils jouent un rôle dans la fermentation des aliments (choucroute, ensilage, produits laitiers et de la viande ainsi que les produits du poisson) et des boissons (König et *al.*, 2009).

Le genre *Lactobacillus* a été créé en 1901 par Beijerinck. Les bactéries de ce genre sont des bacilles ou des coccobacilles regroupées souvent en chainettes, aérotoles et leur pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,5 (Pot, 2008).

C'est un genre hétérogène : ayant un contenu d'ADN en G+C varie entre 33 et 55% (Figure 2). Avec le développement de l'analyse phylogénétique dans les années 1980, des changements ont été portés sur leur classification (Stiles et Holzapfel, 1997). Aujourd'hui, le séquençage des ARN 16S est devenu la méthode de choix, non seulement en raison de son haut degré de précision, mais aussi, en raison de la disponibilité d'une grande base de données de séquences de référence.

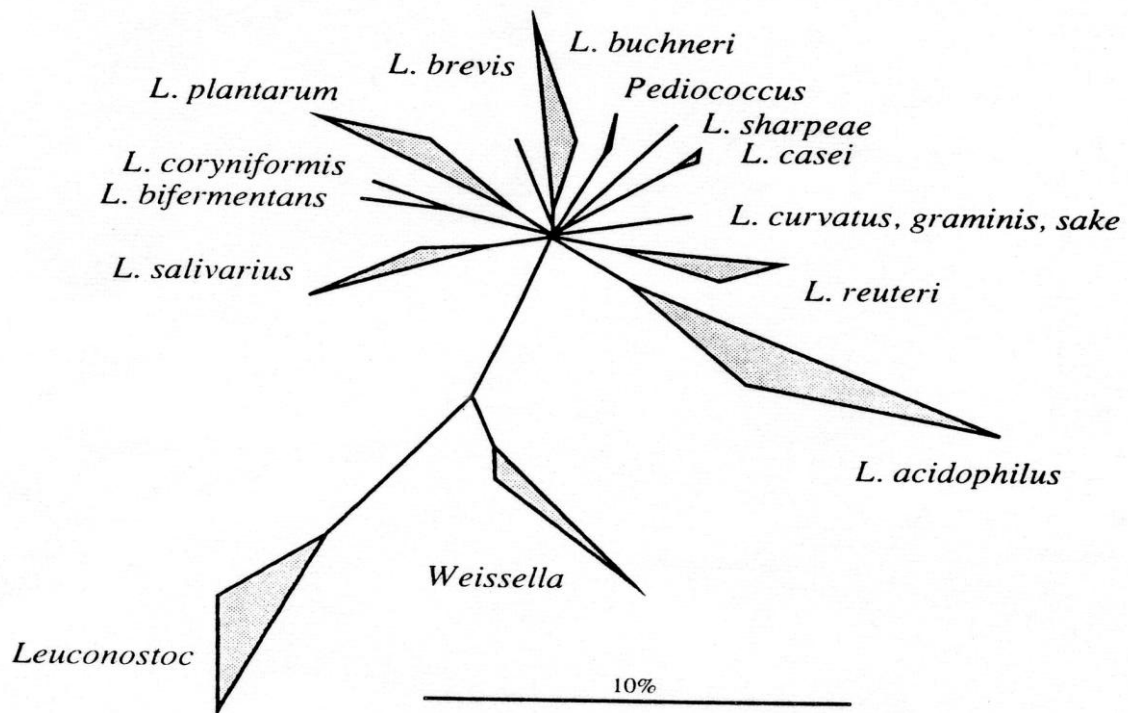


Figure 2 : Arbre phylogénétique des principaux groupes du genre *Lactobacillus* basé sur les séquences des ARNr 16S. La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%.

Adapté de Schleifer et Ludwig, 1995

Les lactobacilles sont strictement fermentaires et ont des besoins nutritionnels complexes : carbohydrates, acides aminés, peptides, acides organiques, bases azotées, vitamines et minéraux. Ils sont anaérobies mais tolèrent l'oxygène (König et al., 2009). Ils sont acidophiles, fournissent un pH de 4,0 dans les aliments contenant un sucre fermentescible. Par conséquent, ils inhibent la croissance d'autres bactéries (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les lactobacilles sont associés à de nombreux habitats différents (Tableau 2). Certaines espèces sont des bactéries commensales de l'homme. Elles se situent au niveau de la cavité buccale, du tractus digestif et du tractus uro-génital et sont importantes pour le maintien de l'équilibre de la flore commensale et donc pour la santé de l'hôte.

Tableau 2 : Habitats des lactobacilles (Stiles et Holzapfel, 1997)

humain	Cavité buccale Tractus intestinal Vagin
D'autres habitats	Plantes et produits végétaux Sols, eau, eaux usées et compost Aliments fermentés (lait, viande et légumes) Produits céréaliers Ensilage

Certaines souches du genre *lactobacillus* sont utilisées pour leur effets bénéfiques sur la santé humaine (Saxelin et *al.*, 2005), *via* leur rôle antagoniste vis à vis des bactéries pathogènes ; soit par l'inhibition de la croissance des pathogènes, leur capacité d'entrer en compétition avec ces derniers pour les ressources nutritives ou bien par la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Reid et Burton, 2002).

La classification classique des lactobacilles a été établie selon le profil fermentaire : (1) homofermentaire strict, (2) hétérofermentaire facultatif et (3) hétérofermentaire strict :

- **Groupe 1** : « *Thermobacterium* » comprend les lactobacilles homofermentaires obligatoires ; fermentent les sucres en acide lactique et ne fermentent pas les pentoses ou gluconate. Les principales espèces utilisées en alimentation sont : *Lb acidophilus*, *Lb delbrueckii* et *Lb helveticus*, ainsi que *Lb jinrciminis* et *Lb kefiranofaciens*. *Lb delbrueckii*, *Lb bulgaricus*, *Lb lactis* et *Lb leichmanii* avaient auparavant classé comme des espèces différentes, puis elles sont reclassées en une seule espèce *Lb delbrueckii* avec les subsp. *delbrueckii*, *bulgaricus* et *lactis* (*Lb*

Leichmanii a été intégréé dans *Lb delbrueckii* subsp *lactis*), vue leur homologie d'ADN de 80% (Weiss *et al.*, 1983).

- **Groupe 2 :** « *Streptobacterium* » comprend les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ; fermentent les hexoses en acides lactique et peuvent produire du gaz à partir du gluconate (pas à partir du glucose). Ils fermentent aussi les pentoses en acides lactique et acétique par une phosphokétolase inductible. Les principales espèces sont: *Lb casei* et *Lb plantarum*. Cette dernière est utilisée dans la culture starter des céréales, des légumes et des produits carnés. *Lb curvatus* et *Lb sakei* sont aussi utilisées dans les cultures starters des produits carnés fermentés. Elles dominent la population microbienne de ces produits (Hammes *et al.*, 1991).
- **Groupe 3:** anciennement appelé « *Betabacterium* » , les lactobacilles appartenant à ce groupe sont hétérofermentaires strictes, fermentent les hexoses en acides lactique, acide acétique et/ou éthanol et dioxyde de carbone. La production du gaz à partir du glucose est la caractéristique principale de ce groupe de lactobacilles. *Lb sanfrancisco* est le principal lactobacille hétérofermentaire strict utilisé dans la fermentation des aliments, il fermente le maltose en produisant de l'acide lactique et acétique et différents composants aromatisants. *Lb brevis* et *Lb fermentum* sont aussi utilisées dans la fermentation des levains panaires.

I-4- Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

Les BL ont une faible aptitude biosynthétique et sont très exigeantes au point de vue nutritionnel. Elles requièrent pour leur croissance non seulement des substrats azotés, carbonés et phosphatés mais aussi des facteurs de croissance telle que les vitamines et les oligoéléments (Desmazeaud, 1983).

I-4-1- Exigences en acides aminés

Les BL exigent la fourniture exogène d'acides aminés pour leur croissance, car elles sont incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source d'azotée simple (Desmazeaud, 1992). Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques ont été déterminées par leur aptitude à croître dans un milieu chimiquement défini (MCD). Ces besoins en acides aminés (Tableau 3) sont cependant variables d'une souche à une autre. D'une manière générale *Streptococcus thermophilus* est l'espèce la moins exigeante (6 acides aminés au maximum)

alors que les lactobacilles sont auxotrophes pour un très grand nombre d'acides aminés (Monnet et *al.*, 2008).

Tableau 3: Besoins en acides aminés des lactobacilles (Monnet et *al.*, 2008)

Lactobacille homofermentaire	<i>Lb. acidophilus</i>		<i>Lb. delbrueckii</i>			<i>Lb. helveticus</i>			Lactobacille hétérofermentaire obligatoire		
	NCTC 1899	ATCC 11506	NCDO 213	<i>ssp bulgaricus</i> CNRZ 397	<i>ssp bulgaricus</i> NCFB 2772	CRL 1062	CRL 974 ATCC 15009	CNRZ 32	<i>L. brevis</i> NCTC 8107	<i>L. buchneri</i> NCDO 110	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338
L-Acide aspartique	ND	+	ND	-	S	-	-	ND	ND	ND	-
L-Acide glutamique	+	+	+	+	S	+	+	ND	+	+	+
DL/L-Alanine	-	S	-	+	+	-	S	ND	-	-	-
L-Arginine	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
L-Asparagine	S	-	+	-	S/+	-	-	ND	-	-	-
L-Cystéine	-	+	+	-	+	-	S	ND	-	+	-
L-Glutamine	-	-	-	-	S	-	-	ND	-	-	-
Glycine	-	S	+	-	S	-	S	ND	-	-	-
L-Histidine	-	+	+	+	+	+	+	ND	S	-	S
L-Isoleucine	S	+	-	+	+	+	+	+	+	S	+
L-Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysine	-	S	-	-	+	-	+	ND	-	-	-
L-Méthionine	-	+	+	+	+	+	+	+	S	-	+
L-Phénylalanine	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Proline	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
L-Sérine	-	+	-	+	+	+	S	ND	-	-	-
L-Thréonine	-	+	-	-	S/+	+	+	+	-	-	-
L-Tryptophane	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
L-Tyrosine	S	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
L-Valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Auxotrophie totale	3	15	11	13	16	13	13	14*	8	5	9

+ : essentiel ; - : non essentiel ; ND : non déterminé ; S : effet stimulant ;

*: détermination incomplète

I-4-2- Exigences en vitamines

Elles sont incapables de synthétiser certaines vitamines indispensables à leur croissance. Celles-ci doivent être fournies par le milieu de culture. Les exigences sont très variables, y

compris au sein d'une même espèce. On distingue les vitamines dont le besoins est absolu, celles qui stimulent la croissance et celles ayant peu d'effet sur la croissance. Généralement, les exigences des BL portent souvent sur des vitamines du groupe B tel que la niacine, la riboflavine et l'acide panthothénique. Le tableau 4 indique les coenzymes correspondants aux vitamines ainsi que leur rôle dans le métabolisme des bactéries.

Tableau 4 : Correspondance entre certaines vitamines, coenzymes, et réactions métaboliques chez les bactéries lactiques (Monnet et *al.*, 2008)

Vitamine	Coenzyme	Réaction faisant intervenir le coenzyme
Thiamine (vitamine B ₁)	Thiamine pyrophosphate (TPP)	Décarboxylation, transfert de groupements carbonés
Riboflavine (vitamine B ₂)	Flavine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD)	Oxydoréductions
Niacine (vitamine B ₃ ou PP)	Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)	Oxydoréductions
Acide pantothénique (vitamine B ₅)	Coenzyme A (CoA)	Transfert de groupements carbonés
Pyridoxine (vitamine B ₆)	Pyridoxal phosphate (PLP)	Transamination, désamination et décarboxylation d'acides aminés
Biotine (vitamine B ₈ ou H)	Biotine	Carboxylations
Acide folique (vitamine B ₉)	Acide tétrahydrofolique (THF)	Transfert de groupements monocarbonés
Cobalamine (vitamine B ₁₂)	Coenzyme B ₁₂	Réactions de réarrangements moléculaires

I-4-3- Exigence en bases azotés

Les bases azotées peuvent être stimulantes pour la croissance des BL. De telles exigences proviennent de l'absence d'enzymes impliquées dans le métabolisme des pyrimidines et des

purines (Monnet et *al.*, 2008). Les streptocoques thermophiles présentent une exigence absolue pour les bases : adénine, guanine, uracile et xanthine tandis que les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytidine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile. En général, chez les lactobacilles, les exigences en bases azotées sont très variables selon les souches ; l'addition de ces composés peut même, chez certaines souches, entraîner des phénomènes d'inhibition de la croissance (Desmazeaud, 1992).

I-4-4- Influence des cations

Les BL ont un besoin en ion remarquable. En effet, les éléments minéraux jouent un rôle essentiel dans la croissance des BL et précisément dans les activités enzymatiques bactériennes. Certaines espèces telles que *Leuconostoc mesenteroides* ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments (Foucaud et *al.*, 1997). Le magnésium est le principal cation divalent des cellules vivantes. C'est un activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique. Cet ion est indispensable pour la croissance de *Lb helveticus* (Desmazeaud, 1992). Le manganèse est essentiel pour la croissance de quelques souches lactiques. En plus de son rôle de cofacteur de réactions enzymatiques, il permet chez certaines espèces de mieux tolérer l'oxygène par l'élimination de l'ion superoxyde. Le potassium est un cofacteur de nombreuses enzymes. Une concentration élevée de potassium est nécessaire pour la synthèse des protéines et la régulation du pH intracellulaire (Monnet et *al.*, 2008).

Les exigences en ions minéraux peuvent varier d'une espèce à autre. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ et Cl^- ont été des composants essentiels dans le milieu de culture de *L plantarum* (Wegkamp et *al.*, 2010). Tandis que Zn^{2+} , Fe^{2+} et Mg^{2+} avait un effet significatif sur la croissance de *Lactococcus lactis* (Zhang et *al.*, 2009).

I-5- Métabolisme des bactéries lactiques

I-5-1- Métabolisme carboné des bactéries lactiques

Le terme BL regroupe des micro-organismes appartenant aux différents genres ayant l'aptitude à fermenter les carbohydrates en acide lactique. Ces carbohydrates peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). Le catabolisme des sucres fournit l'énergie

nécessaire à l'anabolisme sous forme d'ATP et génèrent des coenzymes réduits sous forme de NADH essentiellement (Loubière et Bousquet, 2009).

Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les BL : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide et le système perméase énergie dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Konings et al., 1994). L'une des caractéristiques principales des BL est qu'elles ne sont pas capables d'utiliser qu'un nombre plutôt réduit de source de carbone *via* des voies métaboliques linéaires relativement simples. Suivant les genres ou les espèces, trois voies du métabolisme des sucres sont utilisées : la voie homofermentaire, la voie hétérofermentaire et la voie bifide (Figure 3) (Thomson et Gentry-Weeks, 1994).

- **La voie homofermentaire** est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Le métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu' au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate (Atlan et al., 2008). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).
- **La voie hétérofermentaire :** Certaines bactéries des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent une voie hétérofermentaire qui conduit à la production d'un lactate, d'un éthanol, d'un CO₂ et d'un ATP par mole de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).
- **La voie bifide :** le genre *Bifidobacterium* suit une voie de fermentation particulière appelée voie bifide. Le bilan net de cette voie bifide est 1,0 mole de lactate, 1,5 moles d'acétate et 2,5 moles d'ATP par mole d'hexose, ce qui est légèrement supérieur au rendement de la glycolyse en terme énergétique (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

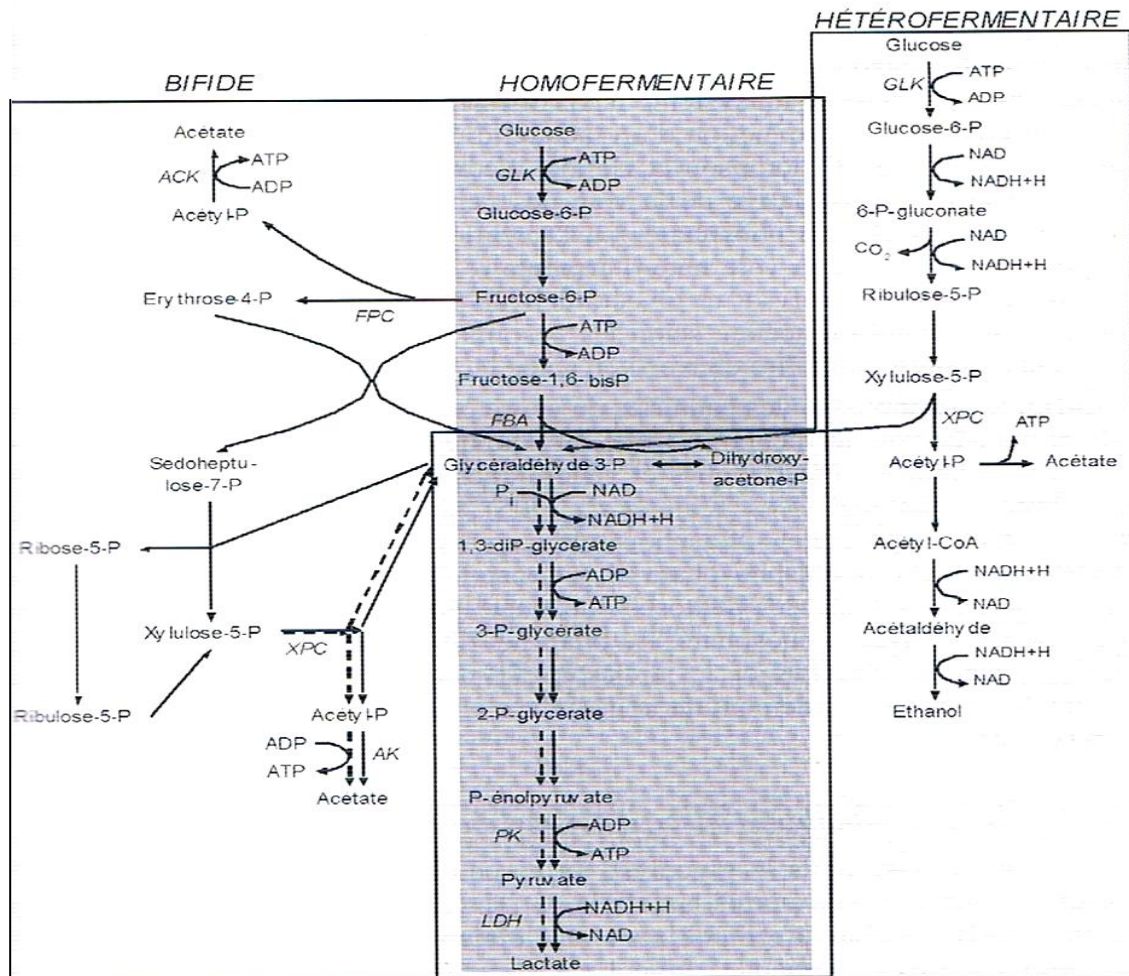


Figure 3 : Voie homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008). *GLK* : gluconase, *FBA* : fructose-6-bisphosphate aldolase, *FPC* : fructose-6-phosphate phosphocétolase, *XPC* : xylulose-6-phosphate phosphocétolase, *PK* : pyruvate kinase, *LDH* ; lactate déshydrogénase, *ACK* : acétate kinase

Les voies métaboliques précédemment citées aboutissent au pyruvate, intermédiaire clé du métabolisme des BL. Chez les lactocoques et les lactobacilles homofermentaires, le pyruvate est converti majoritairement en lactate *via* la lactate déshydrogénase LDH (Figure 4), cette réaction permettant la régénération des coenzymes réduits. Selon les souches, du D-lactate, du L-lactate ou un mélange de D/L est produit. A partir du pyruvate, plusieurs composés, diacétyle, acétoïne, 2,3-butanediol, α-acétolactate peuvent être formés aussi (Atlan et al., 2008).

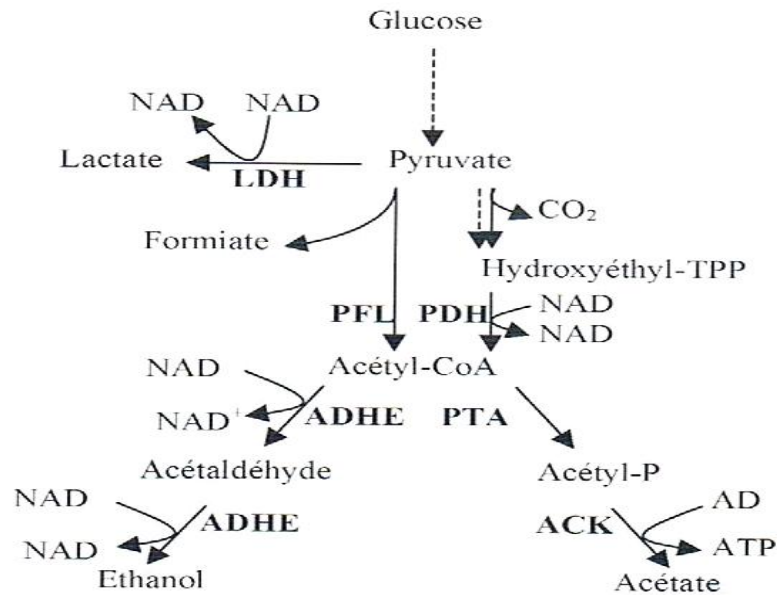


Figure 4 : Métabolisme du pyruvate (Atlan et *al.*, 2008)

I-5-2- Métabolisme azoté des bactéries lactiques

Les BL sont incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés pour lesquels elles sont donc auxotrophes. Ces besoins en acides aminés sont cependant variables d'une souche à une autre (Monnet, 2009). Trois grandes étapes peuvent être distinguées dans le processus de nutrition azotée : la protéolyse extracellulaire, le transport des acides aminés et des peptides dans la bactérie et la protéolyse intracellulaire (Figure 5).

Les acides aminés présents dans le cytoplasme après transport (Tableau 5) et protéolyse vont être utilisés tels quels pour la synthèse protéique, où vont être catabolisés. Ce catabolisme va soit fournir de l'énergie à la bactérie soit aboutir dans certains cas, à la formation de molécules aromatiques (aldéhydes, acides, alcools) (Monnet, 2009).

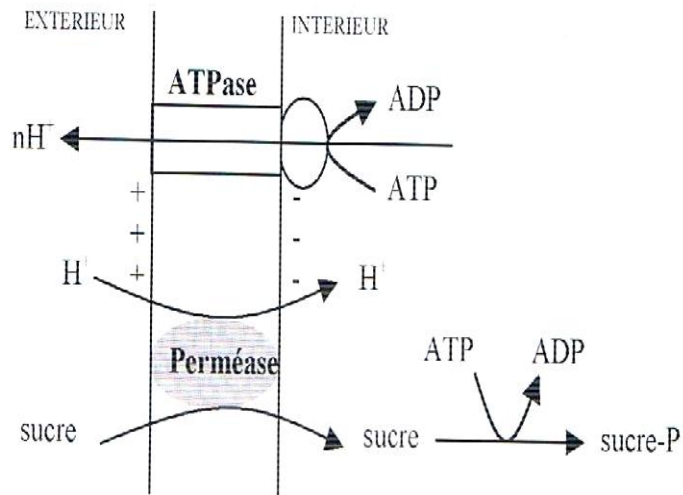


Figure 5 : Système perméase (Monnet , 2009)

ADP :Adénosine diphosphate ; ATP : Adénosine triphosphate

Tableau 5 : Systèmes de transports d'acides aminés identifiés chez les BL (Atlan et *al*, 2008)

transporteur (moteur énergétique)	acides aminés transportés
perméase (force proton-motrice)	Alanine,Glycine
	Thréonine, Sérine
	Isoleucine, Leucine, Valine
	Tyrosine, Phénylalanine
	Méthionine
	Histidine
	Lysine
ABC-transporteur (hydrolyse de l'ATP)	Glutamine, Glutamate
	Asparagine
	Proline, Glycine-bétaïne
Antiport (gradient de concentration)	Arginine/Ornithine
	Glutamate/ γ -aminobutyrate

I-5-3- Métabolisme lipidique

L'activité lipolytique des BL est importante dans l'industrie laitière car elle contribue à la saveur des produits laitiers fermentés. Les BL peuvent effectuer des réactions de transformation d'acides gras comprenant l'isomérisation, l'hydratation, la déshydratation et la saturation. Ces activités peuvent être utilisées dans l'industrie alimentaire et à des fins probiotiques. Par exemple, la réaction de saturation peut être utilisée dans la fabrication d'huiles partiellement hydrogénées (Ogawa et *al.*, 2005). Cependant, la capacité des BL à décomposer les lipides ou à déshydrater les acides gras diffère largement entre les espèces et même les souches. Les BL ne sont pas très lipolytiques comparativement à d'autres espèces bactériennes comme les *Pseudomonas* (Kalagridou-Vassiliadou, 1984). Néanmoins, des activités d'hydrolyse d'esters ont été mesurées chez ce groupe de bactéries. L'estérase de *Lactococcus lactis* est capable d'hydrolyser la matière grasse du lait une fois que celle-ci a été préhydrolysée par d'autres lipases ou estérases (Holland et *al.*, 2004). Trois points communs se dégagent pour les estérases de BL (Atlan et *al.*, 2008) :

- Elles hydrolysent préférentiellement des esters comportant des chaînes d'acides gras en C4 et C6.
- Elles sont inhibées par des inhibiteurs d'enzymes à sérine ce qui permet de les classer dans la famille des hydrolases possédant une sérine dans leur site actif.
- Elles sont très majoritairement décrites comme étant des enzymes localisées à l'intérieur de la bactérie.

Les estérases sont des enzymes clés dans le développement de la saveur du produit fermenté (Atlan et *al.*, 2008).

I-5-4- Métabolisme de citrate

Le citrate est un intermédiaire central du cycle des acides tricarboxyliques, il joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules vivantes. Le citrate est également un précurseur de la synthèse des acides aminés.

Le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à une citrate perméase, puis scindé en acétate et oxaloacétate grâce à une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé par la suite en pyruvate. Le flux du pyruvate provenant du métabolisme est principalement transformé en lactate via la lactate déshydrogénase afin de réoxyder le NADH₂ produit lors du catabolisme du glucose (Figure 6) (Bekal et *al.*, 2009).

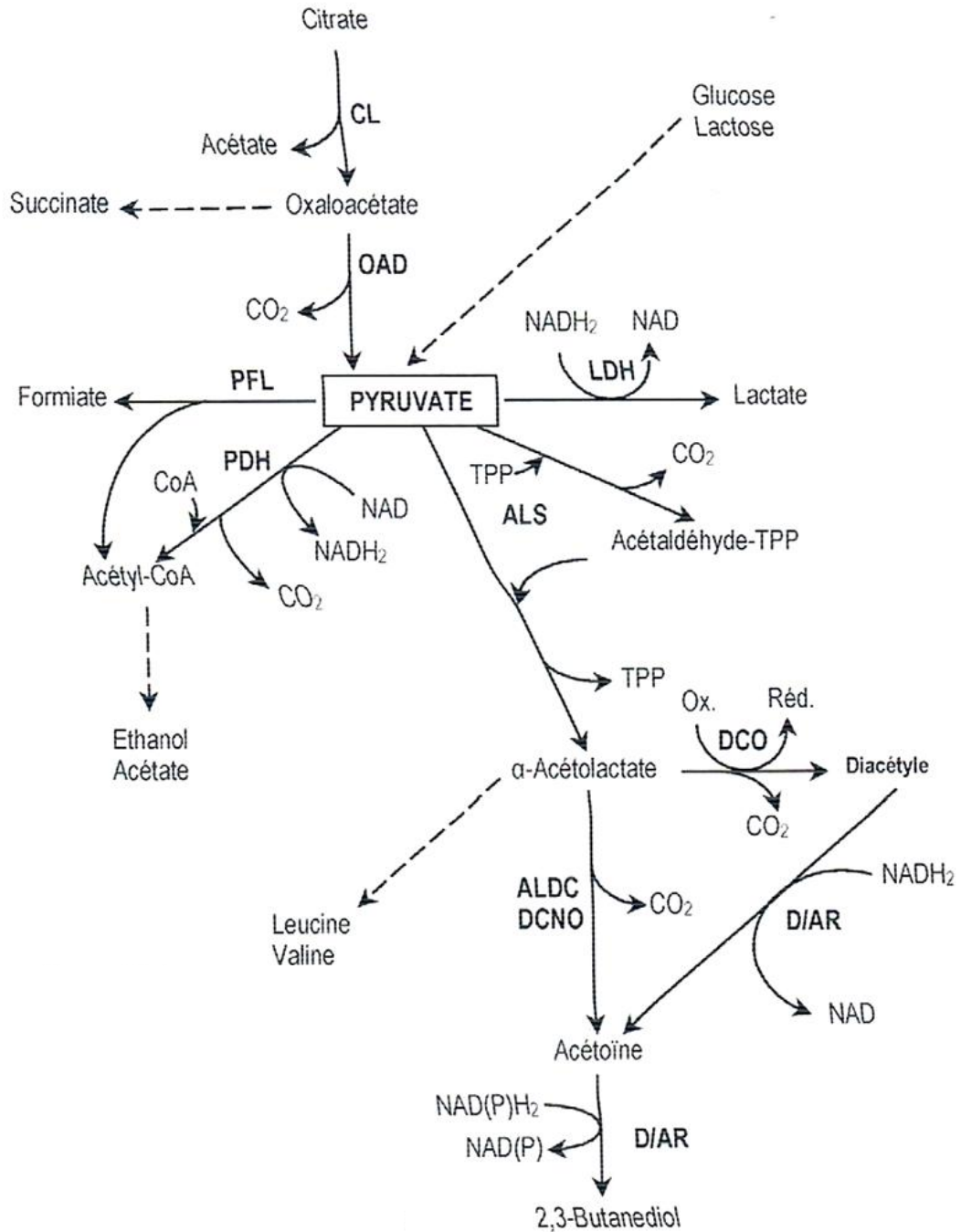


Figure 6 : Principales étapes du métabolisme du citrate chez les BL (Bekal et al., 2009)

CL : citrate lyase ; OAD : oxalacétate décarboxylase, LDH : lactate déshydrogénase ; ALS : α -acétolactate synthase ; PFL : pyruvate formiate lyase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; ALDC : α -acétolactate décarboxylase ; D/AR : diacétyle/acétoïne réductase ; DCO : décarboxylation chimique oxydative ; DCNO : décarboxylation chimique non oxydative

I-6- Applications des bactéries lactiques

Les BL ont un rôle central en plusieurs secteurs tel que: l'industrie alimentaire et pharmaceutique, l'agriculture, et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation en industrie alimentaire constitue l'application majeure de ces bactéries.

I-6-1- La culture starter

La culture starter peut être définie « une préparation microbienne contenant au moins un microorganisme à être ajouté à une matière première pour produire un aliment fermenté ceci par l'accélération de son processus de fermentation ». Le groupe de BL occupe un rôle central dans ces processus, et a une histoire longue dans la production d'aliments et boissons fermentés vue leur production d'acides organiques, éthanol, composés aromatiques, exopolysaccharides, et plusieurs enzymes, ce qui améliore la texture, et contribue au profil sensoriel agréable du produit final (Leroy et De Vuyst, 2004).

I-6-2- Biopréservation des aliments

Les additifs alimentaires chimiques tels que le nitrite, le sulfite, l'acide propionique, l'acide sorbique et l'acide benzoïque sont couramment appliqués dans les technologies de préservation des aliments (Smith, 1993). L'activité antimicrobienne exercée par les BL aide à lutter contre les contaminations microbiennes (Lücke, 2000). Les BL produisent différentes substances antimicrobiennes tel que les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique et acide caproïque), dioxyde de carbone, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, éthanol, bactériocine. L'acide acétique, par exemple, contribue à l'arôme et empêche la détérioration des levains par les moisissures (Messens et De Vuyst, 2002). En outre, les BL se caractérisent par la production des bactériocines. La production in situ de bactériocines peut augmenter la compétitivité de la souche productrice et contribue à la prévention de la détérioration des aliments (Vogel et *al.*, 1993 ; Ross et *al.*, 2000). Plusieurs études ont montré que les BL utilisées dans les cultures starter ont la capacité de produire des bactériocines dans les aliments ce qui inhibe la croissance des souches pathogènes et les souches d'altération (Leroy et De Vuyst, 2004). Des bactériocines peuvent être utilisées comme une alternative au nitrate de potassium afin d'éviter la détérioration tardive du fromage à cause de la contamination par des *Clostridia* (Thomas et *al.*, 2000).

I-6-3- Rôle technologique

La fermentation des aliments par les BL est la conversion des hydrates de carbone en acides organiques (acide lactique notamment) et dioxyde de carbone dans des conditions d'anaérobiose en utilisant des intermédiaires organiques comme donneurs d'électrons et accepteurs d'électrons (Von Wright et Axelsson, 2011). Dans la fabrication des aliments, ces bactéries sont utilisées comme agents aromatisants et texturants. Elles produisent plusieurs composants tels que les exopolysaccharides, l'acétate, l'éthanol, le diacétyle et acétaldéhyde qui peuvent améliorer la texture, l'arôme et la saveur des produits alimentaires fermentés (Badel *et al.*, 2011). Elles acidifient l'aliment, ce qui entraîne un goût d'acide lactique acidulé, elles exercent souvent des activités protéolytiques et lipolytiques, et produisent des composants aromatiques à partir des acides aminés (van Kranenburg *et al.*, 2002). En outre, les polysaccharides augmentent la viscosité et la fermeté, améliorent la texture et réduisent la sensibilité à la synérèse (Leroy et De Vuyst, 2004).

I-6-4- Rôle probiotique

Un probiotique est un microorganisme vivant qui lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, il exerce un effet positif sur la santé (FAO et WHO, 2006).

La notion " probiotique" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares ; grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des BL, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Château *et al.*, 1994). Les probiotiques ont par la suite été en premier lieu utilisés pour leurs effets bénéfiques *via* la modulation du microbiote (l'ensemble des microorganismes vivant dans l'intestin). L'intérêt de l'utilisation des probiotiques est croissant comme le montre le nombre extrêmement élevé de publications concernant leurs potentielles applications médicales (Butel, 2014).

Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en général l'intestin et, d'autre part, agir. Ces caractéristiques requises sont résumées dans la figure 7. L'effet probiotique étant dépendant de la souche, la souche doit être parfaitement identifiée (identifications phénotypique et génotypique) et caractérisée. La souche - de préférence d'origine humaine - doit être stable au cours du procédé de fabrication et de sa conservation avant utilisation. Elle doit résister aux stress

physiologiques rencontrés lors de son ingestion (pH acide de l'environnement gastrique, résistance aux sels biliaires), et doit adhérer afin d'assurer un contact maximum avec la muqueuse intestinale. Par ailleurs, les probiotiques doivent être dénués de pathogénicité, ne pas être porteurs ou en mesure d'acquérir facilement des gènes de résistance aux antibiotiques. Enfin, cette souche doit avoir des effets bénéfiques prouvés chez l'hôte (Butel, 2014). Les probiotiques incluent différentes espèces bactériennes dont les plus courantes sont des bactéries à Gram positif qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Les effets des probiotiques sont multiples. Ils pourraient prévenir certaines maladies telles que les infections systémiques, les maladies diarrhéiques, le cancer et les allergies. Ils jouent un rôle important dans le traitement des maladies inflammatoires et de l'hypercholestérolémie. Ils permettent également d'alléger l'intolérance au lactose et de stimuler le système immunitaire. Enfin, ils procurent à leur hôte des propriétés nutritives par la production de métabolites tels que des acides aminés, des acides gras à chaîne courte et des acides lactiques (Butel, 2014)

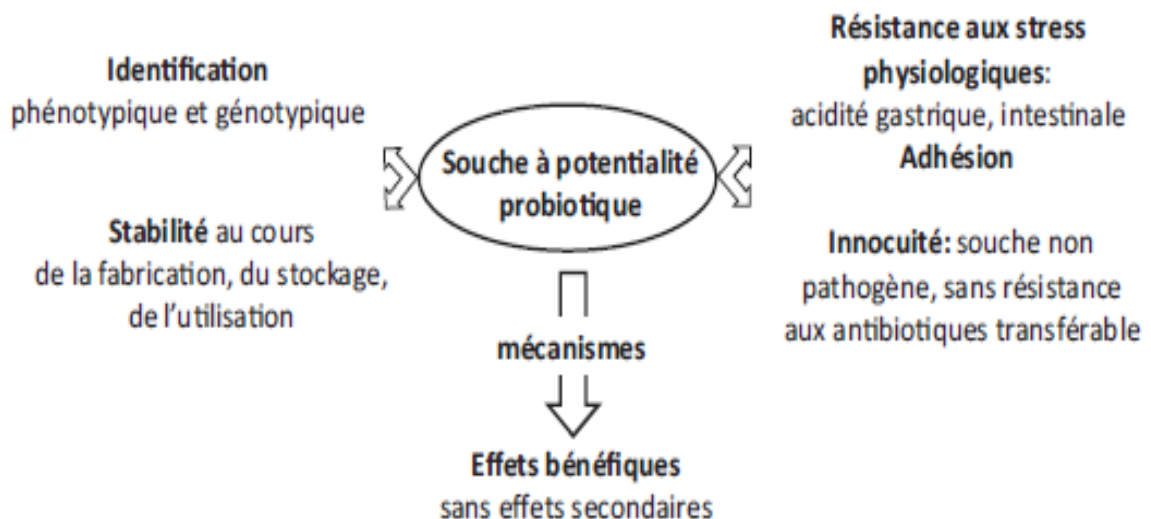


Figure 7 : Caractéristiques des souches probiotiques (Butel, 2014)

I-7- Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques

I-7-1- Milieu de culture

Les BL sont des bactéries exigeantes d'un point de vue nutritionnel. Plusieurs études ont montré leurs exigences en bases azotés, en vitamines indispensables à leur croissance, en acides aminés.....etc. Donc leur croissance nécessite des milieux de culture riches et complexes (Monnet et *al.*, 2008).

I-7-2- La température

La température influence de façon importante le métabolisme des bactéries car elle intervient dans la catalyse de nombreuses enzymes. Les BL regroupent des espèces mésophiles, dont la température optimale de croissance est proche de 30°C, et des espèces thermophiles, dont la température optimale est proche de 42°C. Le genre *Lactobacillus* comprend à la fois des espèces mésophiles (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*....) et des espèces thermophiles (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*....) (Monnet et *al.*, 2008). La température optimale de croissance est généralement inférieure à la température optimale de production d'acide lactique (Béal et *al.*, 1989) mais, supérieure à la température préconisée pour la production de bactériocine (Lejeune et *al.*, 1998). Quand la température du milieu se situe en haut ou en bas de température requise pour la croissance optimale, l'activité microbienne est réduite et le microorganisme peut éventuellement se détruire (Rosso et *al.*, 1995).

Les valeurs de température optimale de croissance des principaux genres des BL sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Températures optimales de croissance des bactéries lactiques

(Monnet et *al.*, 2008)

Genre ou espèce	Températures optimales
<i>Carnobacterium</i>	22 -30 °C
<i>Leuconostoc</i>	18-30 °C
<i>Vagococcus</i>	25-30 °C
<i>Lactococcus</i>	27-32 °C
<i>Pediococcus</i>	25-40 °C
<i>Lactobacillus</i> (mésophiles)	30-35 °C
<i>Enterococcus</i>	30-40 °C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	42-43 °C
<i>Lactobacillus</i> (thermophiles)	40-45 °C

I-7-3- Le pH :

Le pH du milieu influence fortement la croissance des BL. Des changements même faibles du pH interne des BL de l'ordre du dixième d'unité peuvent avoir des influences importantes sur leurs activités métaboliques, on cite le transport des nutriments, la synthèse des protéines, la glycolyse et la synthèse des acides nucléiques. L'aptitude des BL à réguler le pH intracellulaire est un élément physiologique important car, lors de leur culture, elles acidifient le milieu ce qui entraîne une baisse de leurs taux de croissance, jusqu'à l'arrêt complet surtout pour celles qui ne sont pas aptes à maintenir un pH voisin de la neutralité (Canteri, 1997). Toutefois, pour les souches non protéolytiques (*Leuconostoc*, lactocoque protéase

moins), l'arrêt de la croissance est généralement dû à un manque de nutriments azotés (Monnet *et al.*, 2008). Lors de la fermentation, il importe de tenir compte de l'effet du pH de culture sur la viabilité et l'activité des bactéries. Le contrôle du pH au cours de la culture, permet d'une part de stabiliser le pH intracellulaire à une valeur supérieure à la valeur critique de la bactérie (Cachon *et al.*, 1998) et d'autre part, de maintenir l'acide lactique excrété par la cellule sous une forme dissociée afin de limiter l'inhibition créée par sa forme non dissociée (Amrane et Prigent, 1999, Béal *et al.*, 2008). Le tableau 7 situe les valeurs de pH optimales des principales bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière. Des différences peuvent exister entre les souches appartenant à une même espèce.

Tableau 7 : pH optimal de croissance des bactéries lactiques et probiotiques

(Béal *et al.*, 2008)

Espèces bactériennes	pH optimal
<i>Lb acidophilus</i>	5,0 – 5,5
<i>Lb bulgaricus</i>	5,5 – 6,0
<i>Lb casei</i>	4,8 – 5,2
<i>Lb curvatus</i>	5,5
<i>Lb helveticus</i>	5,5
<i>Lb plantarum</i>	5,6 – 6,2
<i>Lb cremoris</i>	6,0 – 6,9
<i>Lb lactis</i>	6,0 – 6,8
<i>Le mesenteroides</i>	5,5
<i>St thermophilus</i>	6,5

I-7-4- Le potentiel redox :

Les BL sont des germes microaérophiles. Elles ne tolèrent que de faible quantité d'oxygène. L'oxygène et les composés qui en sont issus (péroxyde d'hydrogène, radicaux O_2^-) ralentissent ou inhibent la croissance en endommageant certaines enzymes, les lipides membranaires et l'ADN (Piard et Desmazeaud, 1991). L'addition de composés capables de dégrader le peroxyde d'hydrogène (catalase, extrait de levure) permet souvent une amélioration de l'aérotolérance des BL (Monnet et *al.*, 2008). Dave et Shah (1997) et Shah (2000) montrent que l'addition de d'acide ascorbique ou de cystéine permet de réduire la fraction de l'oxygène présent dans les milieux, favorisant ainsi la survie ultérieure des bactéries.

Chapitre II : Les milieux de culture des bactéries lactiques

II -1-Définition d'un milieu de culture

Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide destinée à la croissance, l'isolement, la sélection et la conservation des microorganismes (Presscott, 2003 ; Tortora, 2003). Pour qu'un milieu de culture soit adéquat, il doit répondre aux conditions suivantes :

- Contenir tous les nutriments dont le microorganisme a besoin pour se développer.
- Des conditions physico-chimiques convenables, taux d'humidité adéquat
- Un pH optimal.
- Une pression osmotique et une concentration en oxygène appropriées.
- Un milieu de culture initialement stérile (Tortora, 2003).

II-2- Composition des milieux de culture

La composition d'un bon milieu de culture dépend de l'espèce à cultiver (Presscott ,2003) et le but que l'on veut atteindre car les besoins en éléments nutritifs sont très spécifiques. La connaissance de l'habitat normal d'un microorganisme est souvent utile dans la sélection d'un milieu de culture approprié (Leclerc, 1975 ; Prescott et *al.*, 2003). Les milieux spécifiques à la croissance de la flore lactique sont riches et complexes, contiennent des peptones, d'extraits de levure ou de viande, des minéraux et des facteurs de croissance.

II-2-1- Les peptones : Les peptones sont des hydrolysats de protéines résultant de la digestion chimique ou enzymatique de matières protéiques tel que la viande, la caséine, la gélatine, le soja et autres protéines. Elles servent de source de carbone, d'énergie et d'azote. Elles constituent l'apport azoté permettant d'augmenter la biomasse des microorganismes (production de ferments ou de probiotique) (Presscott et *al.*, 2003). Leur composition varie considérablement suivant la nature de l'enzyme protéolytique. Selon le degré de dégradation, elles contiennent des polypeptides, des tripeptides, des dipeptides et des acides aminés. (Leclerc, 1975). En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. On distingue quatre variétés de peptones : La peptone pepsique, la peptone tryptique, la peptone pancréatique et la peptone papaïnique (Denis, 2007).

II-2-2-les extraits de levure : Ce sont des extraits de levure de bière (Prescott et *al.*, 2003). Ils constituent une source d'acides aminés et surtout de vitamines hydrosolubles et principalement la vitamine B (Tortora, 2003).

II-2-3-l'extrait de viande : C'est le produit d'une infusion de viande de bœuf, filtré et concentrée, il contient des substances solubles dans l'eau : glucides, composés azotés, vitamines hydrosolubles, sels minéraux (Leclerc, 1975).

II- 3- Milieux de culture des bactéries lactiques

Malgré les grandes exigences nutritionnelles des BL, les milieux de culture doivent permettre d'obtenir une biomasse concentrée avec de bons rendements de production et des performances industrielles élevées. Les besoins en nutriments seront satisfaits en fournissant aux microorganismes une ou plusieurs sources azotées, une source carbonée, des vitamines, des minéraux et dans certains cas des acides gras et des bases azotées. (Desmazeaud ,1983). Ces facteurs nutritionnels sont apportés par différents milieux :

II- 3-1- Milieux industriels

a- Le lait

Le lait n'est pas un milieu optimal pour la croissance des BL, son utilisation comme milieu de culture pour la production des levains lactiques présente certains inconvénients (Canteri, 1997) :

- composition non optimale pour la croissance des BL, car il est pauvre en nutriments azotés assimilables et contient un excès de sucre fermentescible (50 mg/ml de lactose),
- Composition variable au cours de l'année,
- Absence de protection phagique,
- Présence éventuelle d'antibiotiques ou antiseptiques,
- prix coûteux.

Ces différents inconvénients ont conduit à l'utilisation d'autres milieux reconstitués à partir de matières premières laitières : lactosérum, perméat d'ultrafiltration...etc.

b - Le lactosérum

C'est un milieu pauvre en matières azotées (8-9 g/l) mais riche en lactose et facteurs de croissance. Pour la production industrielle des ferments il est enrichi en vitamines (notamment celles du groupe B) en cations et en sources d'azote (protéines animales, végétales ou levuriennes ou leurs hydrolysats) qui favorisent la croissance des BL (Lamontagne et *al.*, 2002).

c - MRS végétal

Le bouillon MRS végétal est principalement utilisé pour la culture des lactobacilles et des BL au niveau des fermentations industrielles, pour la préparation des starters utilisés dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Le milieu permet également de cultiver les lactobacilles à croissance ralentie tels que *Lb brevis* et *Lb fermentum*. Par la substitution des peptones d'origine animale par des peptones d'origine végétale, les problèmes réglementaires et sanitaires concernant l'encéphalopathie spongiforme bovine et les pathologies associées sont éliminées, faisant du milieu une formulation idéale pour une excellente croissance (anonyme1).

II- 3-2- Milieux usuels utilisés au laboratoire

A cause de leurs exigences nutritionnelles, il n'existe pas de milieu sélectif pour le dénombrement et l'isolement des BL, et les milieux de culture doivent être très riches en sucre, matière azotées et surtout facteurs de croissance (Larpent, 1996 ; Pilet et *al.*, 1998). Comme les exigences diffèrent d'une souche à une autre il est difficile de cultiver toutes les bactéries sur un seul milieu (Leveau ,1986).

Il existe de nombreux milieux (Tableau 8) pour la culture et l'isolement des BL. Mais, les milieux MRS et M17 demeurent les milieux de choix pour certaines souches de bactéries lactiques (Teuber, 1994).

Tableau 8: Milieux de références les plus employés pour la culture et l'isolement des BL

Genres bactériens	Milieux employés
<i>Streptococcus</i>	Milieu d'Elliker (Elliker , Anderson et Hannesson, 1956).
<i>Lactococcus</i>	Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975).
<i>Lactobacillus</i>	Milieu MRS (De Man, Rogosa et Scharpe, 1960), milieu de Rogosa (Rogosa et <i>al.</i> , 1951).
<i>Pediococcus</i>	Milieu de Mayeux (Mayeux et <i>al.</i> , 1962) Milieu MRS

a- Le milieu Elliker

La plupart des BL peuvent également se développer sur ce milieu (Pilet et *al.*, 1998), il convient à la fois pour les streptocoques et les lactobacilles. Il est non tamponné et peu favorable à la croissance des lactocoques dont la croissance est inhibée quand le pH du milieu atteint des valeurs proche de 5 (Elliker et *al.*, 1956), il est utilisé sous forme liquide ou gélosée pour l'isolement en surface. L'incubation est faite à 35° pendant 18 à 48h (Leveau, 1986).

b- Les milieux spécifiques aux lactobacilles

Plusieurs milieux électifs ou sélectifs ont été développés pour l'isolement et le dénombrement des espèces du genre *Lactobacillus*. Mais, aucun milieu ne permet la croissance exclusive des lactobacilles. Les milieux utilisés pour un dénombrement différentiel de lactobacilles permettent également la croissance de *Lactococcus*, *d'Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Bifidobacterium* et *Pediococcus* (Coeuret et al., 2003). Parmi les différents milieux on cite:

- **Milieu MRS (de Man et al., 1960) :**

Le milieu a été développé en 1960 par de Man, Rogosa et Sharpe, pour satisfaire la croissance des lactobacilles des produits laitiers. Il est utilisé pour l'isolement et le dénombrement des lactobacilles et de la plupart des autres genres de BL (Pilet et al., 1998) et il sert également au repiquage des souches (Brossard, 1997). Son pH est ajusté à 6,5 mais souvent utilisé à pH 5,5 afin de mieux sélectionner ce genre bactérien. Les *Streptococcus* poussent sur ce milieu mais plus lentement que les autres souches des BL (Leveau, 1986).

- **Le milieu SL ou « Selective medium »**

Si les lactobacilles sont dominants, Teuber (1994) propose de les rechercher sur le milieu SL de Rogosa et al. (1951) dont la composition très voisine de celle du MRS. Son pH est ajusté à 5.4 avec de l'acide acétique glacial.

c- Les milieux spécifiques aux lactocoques et aux streptocoques

- **Milieu M17 :**

Mis au point par Terzaghi et Sandine (1975). Ce milieu est le plus utilisé pour le dénombrement de *Streptococcus thermophilus* et des lactocoques. Les streptocoques lactiques sont exigeants et demandent des milieux nutritifs complexes pour une croissance optimale (Elliker et al., 1953 ; Reiter et al., 1962). Ils nécessitent un milieu bien tamponné pour que le pH reste au-dessus de 5,7 pendant leur croissance. Le maintien du pH est important, car une baisse de ce dernier peut léser les germes et réduire ainsi le nombre de streptocoques lactiques recherchés. La gélose M 17 contient du glycérophosphate disodique

qui a un pouvoir tampon suffisant pour maintenir le pH au-dessus de 5,7 même après 24 heures à 30°C.

Shankar et Davies (1977) ont noté que la gélose M 17 convenait à l'isolement et la numération de *Streptococcus thermophilus* dans les yaourts, car la forte concentration de glycérophosphate disodique entraîne la suppression de *Lactobacillus bulgaricus*. La gélose M 17 a été recommandée par la Fédération Internationale Laitière pour la numération sélective de *Streptococcus thermophilus* dans les yaourts. De plus, la gélose permet de rechercher les streptocoques mutants incapables de fermenter le lactose (Terzaghi et *al.*, 1975).

Le milieu M17 à l'acide nalidixique est utilisé pour le dénombrement des *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp lactis var diacetylactis* mais l'incubation se fait à 25° C (Larpent, 1997).

Chapitre III : Le pois, la figue sèche et la caroube : des substrats végétaux locaux

III-1- le pois

III-1-1- Généralités

Le petit pois (*Pisuium sativum L.*) est une plante herbacée annuelle qui appartient à la sous-famille des *Papilionoideae* et la famille des *Fabaceae* (Nyabyenda, 2005). La classification la plus récente du genre *Pisum*, après avoir compté plusieurs espèces, ne regroupe plus que trois espèces (Smykal et al., 2011) :

- *P. sativum L.*
Subsp. *sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*)
Subsp. *elatius*
- *P. fulvum*
- *P. abyssinicum*

Le pois est une légumineuse, il a la faculté de fixer l'azote atmosphérique de l'air, sur la base d'une symbiose avec des bactéries abritées dans les nodosités de ses racines. Le pois est associé symbiotiquement à *Rhizobium leguminosarum* (Brink et Belay, 2006).

Les premières traces de culture du pois datent du début du Néolithique, et ont été trouvées en Irak et en Turquie. Le pois fait partie des premières plantes qui ont fondé l'agriculture en Europe, en Asie centrale et en Egypte, puis en Ethiopie (Doré et Varoquaux, 2006). Le pois est cultivé à deux fins principales :

- **Alimentation humaine** : ce sont les petits pois, produits de plein champ ou de maraîchage, soit pour la consommation en frais, soit pour la conserverie (appertisation ou surgélation), soit en grains secs pour la casserie.

- **Alimentation animale** : ce sont les pois protéagineux, récoltés en grains secs (comme les pois de casserie auxquels ils s'apparentent) et utilisés en alimentation animale, et les pois fourragers, récoltés en vert à la floraison pour une alimentation à l'auge, plus rarement en sec.

III-1-2- Exigences écologiques et climatiques de la plante

Le petit pois a besoin d'un climat tempéré avec une humidité relativement haute mais pas excessive. Il peut être cultivé sur plusieurs types de sols, pourvu qu'ils soient bien drainés et aérés. Il ne supporte pas les marais (Nyabyenda, 2005).

III-1-3- Morphologie de la plante

Racines : Le petit pois forme une racine principale pivotante développée et des racines secondaires latérales. Des nodules globulaires peuvent se développer sur la racine principale des jeunes plants.

Tige, feuilles et ramifications : Le petit pois forme une tige herbacée angulaire ou cylindrique avec peu ou pas de ramifications. Le plant est plus ou moins grimpant suivant les types. La tige est constituée de plusieurs entre-nœuds creux, souvent pourpres à la base et avec des stipules larges. Il forme des feuilles alternantes avec 1-3 paire de folioles et un long pétiole creux. Les folioles opposées ou non sont rhomboïdes, asymétriques et pourvues de courts pétioles.

Inflorescences et fructification : Les inflorescences du petit pois sont des racèmes axillaires pourvus de 1-2 fleurs blanches ou pourpres avec un pédoncule cylindrique et creux, plus ou moins long suivant les types (1,5-12 cm de long). La fleur de type papilionacé comprend 5 pétales, 5 sépales et 10 étamines. La fécondation se fait par auto-pollinisation. Le fruit est une gousse à deux valves et d'une longueur de 4,8-8 cm. Les gousses contiennent en moyenne 2 à 5 graines. (Nyabyenda, 2005).

III-1-4- Le pois cassé

C'est un légume sec provenant de la récolte à maturité complète des graines de pois potager ou petit pois. Le grain a un gros calibre et une enveloppe fine pour faciliter le décorticage (Doré et Varoquaux, 2006). Après la récolte, les pois sont traités en casserie :

- Leur peau ou pellicule cellulosique sont enlevées
- Les pois se séparent en deux parties
- Ils sont souvent glacés par frottement entre eux.

III-1-5- Production

Le pois est une légumineuse de grande culture de saison fraîche qui est cultivé sur plus de 25 millions d'acres dans le monde entier. La figure 8 montre la production du pois en Algérie.

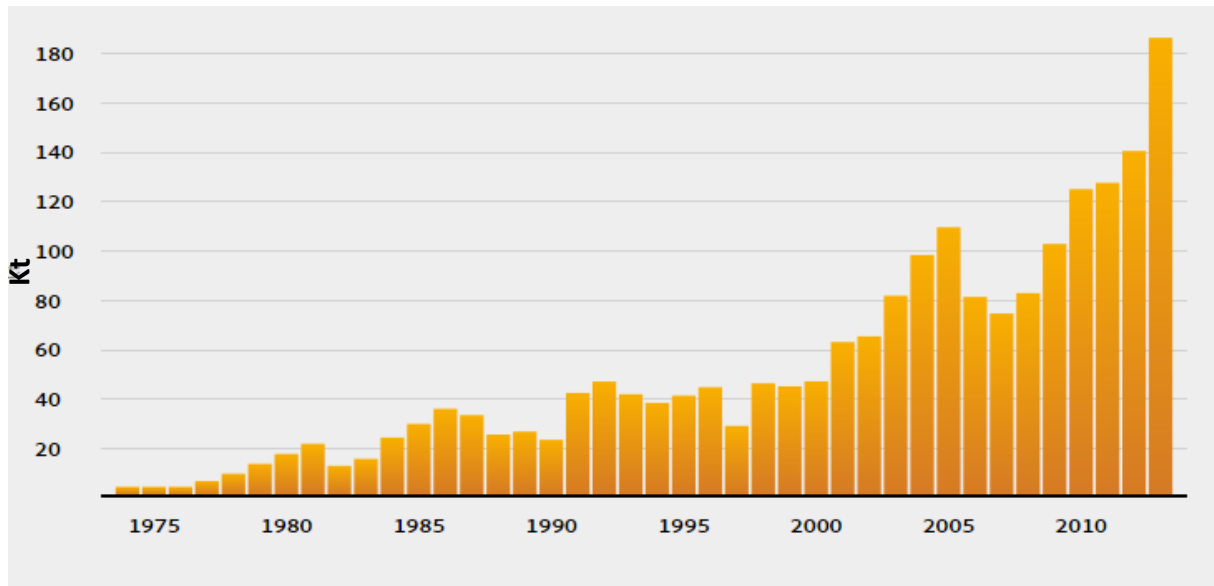


Figure8 : Production du pois en Algérie (Anonyme 2)

III-1-6- **Composition** : Le tableau 9 présente la composition chimique du pois.

Tableau 9 : Composition chimique du pois (Martin et *al.*, 2013)

composition		pois
matière sèche	g/100g	87,32 ± 0,08
condres	g/100g	3,00 ± 0,01
matière grasse	g/100g ps	1,11 ± 0,02
protéine	g/100g ps	25,93 ± 0,31
fibres	g/100g ps	7,68 ± 0,10
amidon	g/100g ps	49,48 ± 0,24

ps : poids sec

III-2- La figue sèche

III-2-1- Caractéristiques générales

La figue sèche est le produit obtenu à partir des fruits secs mûrs de cultivars crus de *Ficus carica* L, de la famille *Moraceae* (Akbas et Ozdemir, 2008). Avec 1400 espèces classées en 40 genres (Watsonand Dallwitz, 2004). Le genre *Ficus*, comprend environ 700 espèces qui se trouvent essentiellement dans les zones tropicales (Berg.2003.). Les variétés de figues principales pour le séchage sont Sarılop (syn. Calimyrna) en Turquie; Kalamata en Grèce; Adriatique, Conadria, Mission, Kadota et Calimyrna en Californie, les USA; Zidi en Afrique du Nord; et Sultani en Egypte et Tunisie (Stover et *al.*, 2007).

F. carica, avait un rôle important dans l'alimentation humaine à travers l'histoire. C'est une source de nutrition importante pour les humains dans la région Méditerranéenne depuis le début de l'histoire humaine. Basée sur des trouvailles archéologiques, les figues étaient probablement une des premières plantes plantées domestiquement, il y a environ 12000 ans (Kislev et *al.*, 2006, Meslay et Delarozière, 2007). Il secrète un latex abondant qui irrite la peau et ses feuilles caduques, aux lobes découpés, sont caractéristiques.

III-2-2- Description botanique

D'un point de vue botanique, le fruit de la figue est un sycone, une structure en forme de coquille avec un ostiole, qui est en partie fermé avec des écailles. Le développement du fruit révèle une double courbe sigmoïde. Le diamètre du fruit augmente rapidement durant la première période de croissance mais l'augmentation du poids est lente. Il n'y a presque pas de changement dans le diamètre ou le poids du fruit durant la deuxième période de croissance. Le diamètre et le poids de la figue sèche et mûre augmentent rapidement durant la troisième période. Sept pour cent du poids sec et 90 pour cent des sucres totaux sont accumulés durant cette phase de croissance qui dure de 2 à 5 semaines dans la plupart des variétés (Aksoy, 1981).

III-2-3- Composition

Le tableau 10 montre la composition des figues sèches.

Tableau 10 : Composition des figes sèches (Vinson, 1999)

composant	100g de FS
matière grasse	0,52 g
sodium	12,26 mg
potassium	609 mg
carbohydrate	66,16 g
fibres	12,21 g
sucre	49 g
protéine	3,1 g
vitamine A	9,7 UI
vitamine C	0,68 mg
calcium	133 mg
fer	3,07 mg

III-2-4- Exigences climatiques et écologiques

Les figiers sont particulièrement bien adaptés au climat méditerranéen avec des hivers frais et des étés chauds et secs. Pour les figes, la température optimale moyenne pour la croissance est de 18-20°C, mais elles requièrent une température plus élevée (environ 30°C) durant la maturation du fruit et la phase de séchage qui apparaît en août et en septembre. Pour obtenir une récolte de haute qualité, l'humidité relative doit être autour de 40-50 pour cent durant la période de séchage. La valeur en pH du sol devrait être entre 6.0 et 7.8 (Aksoy *et al.*, 2001). Le figier peut atteindre 12 m et vivre 300 ans. Peu exigeant, il s'accommode de sols pauvres mais réclame une quantité d'eau suffisante (Meslay et Delarozière, 2007).

III-2-5- Reproduction

Il y a des figiers mâles ou « caprifigiers » et des figiers femelles. La production de figes consommables peut se faire de deux manières :

- en association symbiotique avec un petit hyménoptère, le blastophage, qui se multiplie dans les petites figes du caprifigier puis transporte le pollen sur les fleurs femelles

du figuier femelle afin d'assurer la fécondation ; la figue mûre sera alors comestible en septembre.

- Par pathogénèse, sans fécondation des fleurs femelles contenues dans les figes femelles, en juillet ; ce sont les « figes-fleurs » ; ce processus se déroule aussi dans les régions où le blastophage est absent (Meslay et Delarozière, 2007).

III-2-6- Production

L'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (2005) estime que les figes sont récoltées à partir de 427.000 hectares à travers le monde qui produisent chaque année plus de 1 millions de tonnes (t) de figes ; la Turquie, l'Égypte, l'Iran, la Grèce, l'Algérie, le Maroc, le Royaume- Unis, la Syrie et l'Espagne produisent 70% (FAOSTAT, 2005).

III-2-7- La méthode de séchage des figes

Le séchage au soleil est la méthode classique utilisée pour obtenir des figes sèches, ne nécessitant que simple équipement. En particulier, cette méthode produit des figes avec de très bonnes propriétés sensorielles (Piga et *al.*, 2004). L'énergie solaire est une importante source d'énergie alternative et préférée à d'autres sources d'énergie, car elle est abondante, inépuisable et non-polluante. En outre, elle est renouvelable et pas cher (Doymaz,2004). Cependant, la déshydratation mécanique de l'air a pris de l'importance vu leurs avantages par rapport à la méthode classique tel que : (a) elle n'est pas conditionné par les changements météorologiques ; (b) la réduction du temps de séchage ; (c) le contrôle des paramètres de séchage (Piga et *al.*, 2004) .

III-3- La caroube

III-3-1- Classification

Le mot "caroubier" venant de l'arabe *al kharroube*, est connu sous le nom scientifique de *Ceratonia siliqua* L. qui désigne en grec *keratia* (*Ceratonia*) signifiant petite corne et le nom d'espèce *siliqua*, désigne en latin une silique ou gousse. Il est aussi appelé Carouge, figuier d'Égypte, fève de Pythagore. Cette espèce appartient au genre *Ceratonia* de la famille des Leguminosae qui fait partie de l'ordre des Rosales. C'est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs comprenant 650 genres et plus de 18 000 espèces et est extrêmement variable dans la morphologie et l'écologie (Batlle et Tous, 1997).

III-3-2- Historique

Le caroubier a été domestiqué depuis l'ère néolithique et ces centres d'origine semblent être la Turquie, la Syrie et la Péninsule arabique. Diffusée par les Grecs, la culture a été ensuite introduite en Afrique du Nord par les Arabes. Après l'Amérique du Sud, l'Inde, l'Afrique du Sud, on le trouve également aux Philippines et en Iran (Berrougui, 2007).

II-3-3- Ecologie

Le caroubier est un arbre persistant qui vive à long terme. C'est une composante importante de la végétation méditerranéenne, sa culture nécessite des sols calcaires marginaux qui sont dominants dans cette région. Il pousse bien dans les zones tempérées et subtropicales chaudes, et tolère les zones côtières chaudes et humides (figure 9) (Batlle et Tous, 1997). Il tolère des conditions extrêmes tel que , la sécheresse et les sols alcalins. Ils sont utilisés naturellement contre l'érosion des sols et la remise en état des terres dans la plupart des régions méditerranéennes (Janick et Paull, 2008)



Figure 9: Centres d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997)

III-3-4- Description botanique

Le caroubier est un arbre ou arbuste à feuilles persistantes. Il peut atteindre 10 m de haut et se caractérise par un tronc épais et des branches robustes.

Ses feuilles persistantes de 10 à 20 cm se caractérisent par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm elles sont coriaces, entières, ovales à elliptiques, paripennées, légèrement échancrées de couleur verte avec des marges légèrement ondulées (Orwa et *al.*, 2009).

Les fleurs sont nombreuses et de petites tailles : 6-12 mm, de couleur verte, disposées en spirale le long de l'axe de l'inflorescence. Les fleurs femelles se composent d'un pistil (6-8,5 mm) sur un disque nectarifère est entouré de 5 à 6 sépales rudimentaires. Les mâles se composent d'un disque nectarifère composé de 5 étamines. Dans le centre du disque, il y a un pistil rudimentaire (Orwa et *al.*, 2009). En effet, Les fleurs sont d'abord bisexuelles, mais un sexe est supprimé au cours du développement des fleurs fonctionnelles mâles ou femelles (Battle et Tous, 1997). Le fruit du caroubier, appelé caroube, est une gousse indéhiscente à bords irréguliers, de forme allongée, rectiligne ou courbée, de 10 à 30 cm de longueur, 1,5 à 3 cm de largeur et de 1 cm d'épaisseur (Orwa et *al.*, 2009), d'abord verte, et elle devient brun foncé à maturité. Elle se compose d'une couche externe (péricarpe), une couche interne (mésocarpe) et des graines séparées les unes des autres par des cloisons pulpeuses. La croissance du fruit passe par trois stades : une croissance lente avec une légère augmentation du poids (janvier-avril), une croissance rapide (avril-juin) et une croissance lente et maturation du fruit (juin-septembre) (Battle et Tous, 1997).

III-3-5- Propriétés

Les deux principaux constituants de la caroube sont : la pulpe (90%) et les graines (10%). La composition chimique de la pulpe est : 48-56% de sucre (sucrose, glucose, fructose et maltose), 18% cellulose et hemicellulose, 16-20% tannins, 1-2% protéines digestibles (faible digestibilité car elles sont liées avec des tannins et des fibres). Sa composition minérale (mg/100g de pulpe) est : K=1100, Ca=307, Mg=42, Na=13, Cu=0.23, Fe=104, Mn=0.4, Zn=0.59 (Battle et Tous, 1997).

III-3-6- Utilisation

Toutes les composantes du caroubier sont exploitées. Le traitement des graines donne lieu à une gomme utilisée dans l'alimentation, la confiserie, le secteur cosmétique et pharmaceutique. La pulpe est utilisée dans la préparation de jus sucrés, de chocolat et dans l'alimentation animale. Les fleurs constituent une source de nectar pour les abeilles et l'apiculture. Sur le plan phytochimique, les recherches scientifiques ont démontré que cette plante est riche en antioxydants (flavonoïdes, isoflavonoïdes, tannins, composés phénoliques...), en sucre, protéines, fibres, potassium, calcium. En thérapeutique, cette plante est connue pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, anti-diarrhéique, troubles digestifs (Berrougui, 2007).

Chapitre IV : Les modèles expérimentaux

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à *une réponse* qu'il mesure à chaque essai. Sa valeur dépend de un ou de plusieurs variables nommés *facteurs*.

Afin de déterminer l'influence d'un ou de plusieurs facteurs sur une réponse déterminée, différents modèles expérimentaux sont appliqués tel que : le modèle conventionnel et les plans d'expériences.

IV-1- Le modèle conventionnel

L'approche expérimentale conventionnelle pour l'optimisation des milieux par la méthode "un facteur à la fois" consiste à étudier l'influence d'un seul facteur à un temps donné tout en maintenant les autres facteurs à un niveau constant. C'est la plus ancienne méthode largement utilisée dans le processus d'optimisation. Mais, elle représente deux inconvénients majeurs : elle ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs étudiés donc elle est incapable de détecter l'optimum réel surtout lorsque ces interactions sont significatives. Dans le cas d'un nombre important de facteurs, un grand nombre d'expériences est relativement impliqué ce qui rend l'expérimentation longue et coûteuse.

Donc, Les plans d'expériences fournissent une alternative, car avec ces derniers, on obtient un maximum de renseignements avec un minimum d'expériences.

IV-2- Les plans d'expériences

Les plans d'expériences constituent essentiellement une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. Le choix du plan d'expérience dépend de la nature des questions à traiter, du degré de généralité recherché pour les conclusions, et des ressources disponibles (matériau expérimental, personnel, contraintes de temps) (Dagnelie, 2000).

Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une réponse y , et des facteurs x_i . Ils permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (Goupy, 2006).

Un plan d'expérience consiste donc aussi à proposer peu d'expériences tout en faisant varier tous les facteurs simultanément afin d'obtenir un maximum d'informations (cette démarche est diamétralement opposée à celle de la technique "un facteur à la fois") (Tinsson, 2010)

Contrairement au modèle conventionnel, les plans d'expérience permet de décrire les interactions entre les différents facteurs.

Un phénomène étudié peut toujours être modélisé sous la forme mathématique :

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Y est la réponse à laquelle l'expérimentateur s'intéresse,

f la fonction mathématique exprimant le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs des facteurs

x_i les variables ou facteurs

La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*.

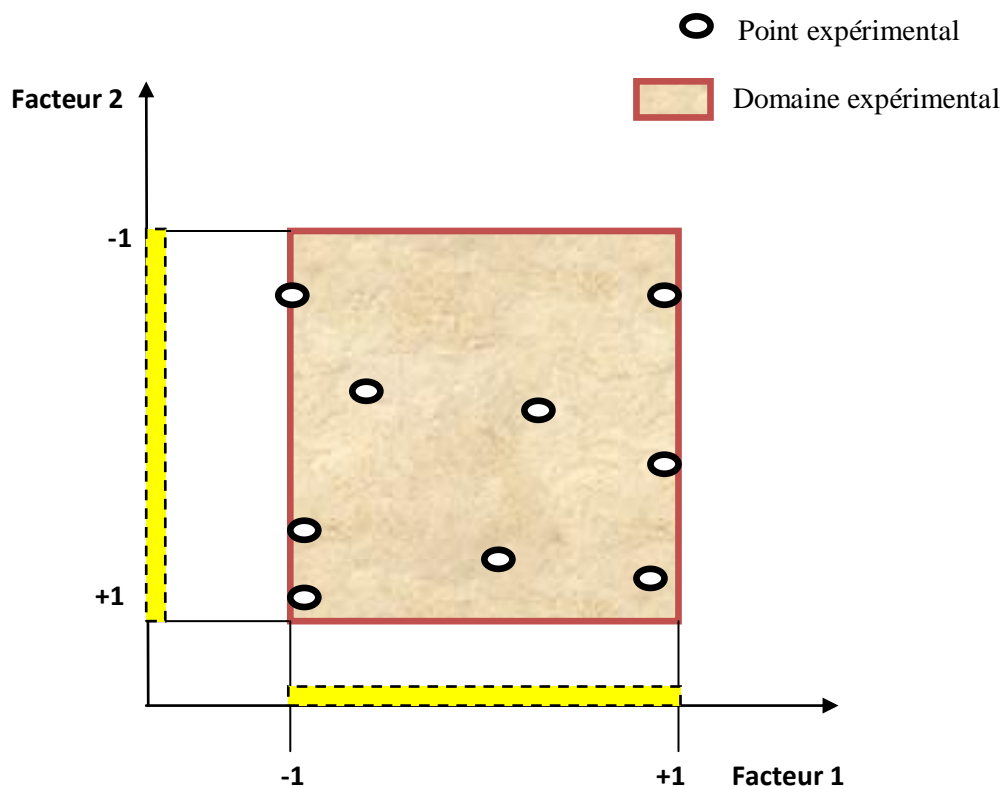


Figure 10 : Points expérimentaux disposés dans un domaine expérimental (Goupy, 2006)

Il existe différents types de plan d'expérience tel que : le plan factoriel complet, le plan factoriel fractionnaire

IV- 2-1- Plans factoriel complets à deux niveaux

Les plans factoriels complets prennent en compte l'étude des facteurs ayant chacun deux niveaux. Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes.

- **Plan à deux facteurs**

Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + e$$

y est la réponse, x_i représente le niveau attribué au facteur i , a_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, a_1 est l'effet (ou effet principal) du facteur 1, a_2 est l'effet (ou effet principal) du facteur 2, a_{12} est l'interaction entre les facteurs 1 et 2, e est l'écart.

- **Plans factoriels à k facteurs à 2 niveaux**

Un plan comportant k facteurs à deux niveaux est noté 2^k .

- Le k en exposant signifie qu'il y a k facteurs étudiés.
- Le 2 indique le nombre de niveaux par facteur.

Cette notation montre que le nombre des expériences dans un modèle factoriel complet croît géométriquement avec le nombre des facteurs, par exemple pour seulement 6 facteurs, il faudrait exécuter 64 essais. Donc, la procédure ne devient pas économique et réalisable.

IV-2-2- Plans factoriels fractionnaires

Les plans factoriels fractionnaires permettent de diminuer le nombre des essais en conservant la possibilité d'étudier tous les facteurs comparativement aux plans factoriels complets.

Les plans d'expériences les plus utilisés sont le plan de Plackett et Burman (1946) et le plan de Box et Wilson (1951).

- **Plan de Plackett et Burman** (Plackett et Burman, 1946)

Ces plans sont utilisés pour sélectionner les facteurs les plus influents sur la réponse Y et où les interactions sont négligeables ou supposées négligeables.

Les matrices de calcul des plans de Plackett et Burman sont des matrices d'Hadamard construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base (Tableau 11). Ces matrices permettant d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux (-1) et (+1) sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N (N = k+1). Ce type de plan permet de sélectionner les facteurs ayant un effet significatif sur la réponse en un nombre limité d'essais.

Le modèle mathématique de ce type d'étude est :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

L'effet β_i ayant la plus grande valeur absolue correspond à l'élément le plus significatif X_i .

Tableau 11 : Générateur des matrices selon Plackett et Burman (1946).

N_H	Séquences de niveaux
4	+ + -
8	+ + + - + - -
12	+ + - + + + - - - + -
16	+ + + + - + - + + - - - + - - -
20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -
24	+ + + + - + - + + - - + + - - - + - + - - - -
32	- - - - + - + - + + + - + + - - - + + + + - - + + - + - - +

N_H : nombre d'expérience

- **Plan composite centré**

Les bactéries lactiques constituent le groupe des microorganismes le plus utilisé en biotechnologie vue leurs propriétés technologiques et /ou probiotiques. Ces propriétés sont liées à leur croissance qui est conditionnée par la composition du milieu de culture et les conditions physicochimiques de culture. Le plan de Box et Wilson en 1951 permet de déterminer les optima des facteurs significatifs permettant la réponse maximale. Ce plan est formé de trois parties distinctes pour générer un nombre de traitements de combinaisons égal à $2^k + 2.k + N$

La méthode de surface des réponses permet, grâce à des modèles mathématiques empiriques, d'optimiser les paramètres du procédé afin d'atteindre des réponses souhaitables. Les plans composites centrés (CCD) sont très utilisés et ont une grande popularité auprès des praticiens. En effet, ce type de plans nécessite 5 niveaux différents pour chacun des facteurs ($-\alpha, -1, 0, +1, \alpha$).



Matériel et Méthodes

I -Matériel

Le matériel utilisé est constitué de :

1) Cinq lactobacilles :

- *Lb brevis* **CHTD27** et *Lb plantarum* **BH14** : isolés et identifiés par l'équipe de Karem N.E _ Karem –ZADI : Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Faculté des Sciences, Département de Biotechnologie, Université d'Es Senia.
- *Lb rhamnosus* **O.H.P.P**: lactobacilli d'Origine **H**umaine, **P**otentiellement **P**robiotique a été isolé des fèces de nourrissons sains et allaités, identifié et caractérisé dans le cadre du projet de recherche en 2002 ayant pour thème : « Isolement et caractérisation de souches autochtones de bactéries lactiques en vue de leur utilisation dans la fabrication des produits fermentés à effets probiotiques».
- *Lb farciminis* **DSM 20184**.
- *Lb fermentum* **DSM 20049**.

2) Le milieu MRS liquide utilisé pour la préparation des ferments, et le milieu MRS gélosé utilisé pour le dénombrement et la conservation des souches des lactobacilles. Sa composition est présentée dans l'annexe 1.

3) Le milieu MRS végétal témoin.

4) Les milieux élaborés à partir des substrats végétaux ; pois cassé, figue sèche et caroube achetés au commerce.

II- Méthodes

II-1 - Revivification et contrôles de la pureté des souches

Les souches lyophilisées ou conservées sur MRS gélosé ou MRS glycérolé sont revivifiées sur le bouillon MRS. Pour chaque souche on procède à l'étude du Gram et de la catalase.

➤ Étude de la morphologie et du Gram

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux groupes, les bactéries Gram positif se colorant en violet et les bactéries Gram négatif se colorant en rose. Elle permet aussi d'observer la morphologie et l'arrangement cellulaire. La morphologie des cellules bactériennes (forme, taille et mode d'association) est révélée après coloration par la technique de Gram (Prescott et *al.*, 2003) par observation microscopique.

➤ Étude de la catalase :

Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes). Un dégagement gazeux abondant (dû à un dégagement de dioxygène) sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

➤ Conservation des bactéries :

La conservation de courte durée des bactéries est effectuée à 4°C sur gélose inclinée en tubes, avec un repiquage toutes les 3 semaines. Pour la conservation de longue durée, les souches sont conservées à - 20°C dans du lait écrémé à 10%.

II- 2- Préparation des milieux de culture

II-2-1- MRS végétal

Le milieu MRS est utilisé comme témoins dans notre étude. Le tableau 12 montre sa composition (Anonyme 1). Le pH du milieu est ajusté à 6,4 et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Tableau 12 : Composition du MRS végétal

composant	concentration
Peptone de soja	20 g ^l ⁻¹
Extrait autolytique de levure	5 g ^l ⁻¹
Glucose	20 g ^l ⁻¹
Tween 80	1 ml l ⁻¹
Phosphate dipotassique	2 g ^l ⁻¹
Acétate de sodium	5 g ^l ⁻¹
Citrate d'ammonium	2 g ^l ⁻¹
Sulfate de magnésium	0,20 g ^l ⁻¹
Sulfate de manganèse	0,05 g ^l ⁻¹

II-2-2-Préparation des jus des substrats végétaux

Trois jus végétaux sont élaborés selon les protocoles suivants :

➤ Préparation de jus de pois cassé (JPC)

Les pois cassés sont broyés jusqu'à l'obtention d'une farine. 50g du broyat sont dilués dans 450ml d'eau distillée de pH 9. Le mélange est agité pendant 30 mn pour bien dissoudre la farine. Après agitation, le pH du mélange est ajusté à pH 6 pour ajouter la papaine en raison de $100 \mu\text{g l}^{-1}$. La préparation est incubée au Bain Marie à 60°C pendant 2h, puis centrifugé à $3500 \text{ rpm min}^{-1}$ pendant 15 min. Le surnageant recueilli est chauffé à 100°C pendant 20 mn puis recentrifugé à $4000 \text{ rpm min}^{-1}$ pendant 15 mn. Le surnageant est récupéré et utilisé pour l'élaboration des milieux de culture.

➤ Préparation de jus de figue sèche (JFS)

Les figues sèches sont bien lavées et nettoyées. 250 g des figues sèches sont rajoutées à 500 ml d'eau distillée et chauffé à 90°C pendant 1h. Après un broyage, 100g du mélange est ajouté à 450 ml d'eau distillée, puis mélangé pendant 30 min et centrifugé à $4000 \text{ rpm min}^{-1}$ pendant 20 min. le surnageant recueilli est utilisé pour l'élaboration des milieux de culture.

➤ Préparation de jus de caroube (JC)

Les caroubes sont lavées et broyées. 50 g du broyat est dilué dans 450 ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 30 min puis centrifugé à $4000 \text{ rpm min}^{-1}$ pendant 20 min. Le surnageant est récupéré et utilisé pour la formulation de nouveaux milieux de culture.

II-3- Méthodes analytiques

II-3-1- Détermination de la matière sèche (Le coq, 1965)

Le principe de cette méthode consiste à peser le résidu après dessiccation à l'étuve à plus de 105°C .

La matière sèche des trois jus végétaux est déterminée par séchage d'un échantillon de 5 ml introduit dans une capsule séchée et placée dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Le taux de la matière sèche est calculé (en %) selon la formule :

$$H = (P_0 - P) \times 100 / P_0$$

P_0 : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée ;

$$\text{MS (\%)} = 100 - H (\%) \quad \text{d'où } H : \text{humidité}$$

II-3-2- Détermination des cendres (Le coq, 1965)

La teneur en cendres correspond conventionnellement à la masse du résidu d'incinération de la substance dans les conditions déterminées ci-après. Les capsules contenant la prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche sont portées au four à moufle électrique et chauffées très progressivement jusqu'à 550°C. Les échantillons sont maintenus à cette température pendant 5 h.

Le taux de la matière organique (MO) exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante : $MO = (P_0 - P) \times 100 / P_0$

Dont P_0 : poids initial en gramme de la prise d'essai ;

P : poids en gramme du résidu gris résultant de l'incinération ;

$C (\%) = 100 - MO (\%)$ d'où C : cendres

II-3-4-Dosage des sels minéraux

Ce dosage a été réalisé au niveau du laboratoire Agronomique – Ferial – Annaba (Annexe 2).

II-3-5- Détermination des sucres totaux (Dubois et al., 1956)

Les sucres totaux des jus végétaux sont déterminés par la méthode « *phenol-sulfuric-acid* ». Les sucres sont dégradés à chaud en présence d'acide sulfurique concentré, ce qui provoque le départ de plusieurs molécules d'eau. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner le complexe jaune-orangé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses en cause.

Le protocole consiste à ajouter à 1 ml de l'échantillon dilué 1 ml de phénol à 5% et 5 ml de l'acide sulfurique 95% de pureté. Après agitation, le mélange réactionnel est laissé reposer 10 min à température ambiante. Il est ensuite incubé au Bain-Marie à 30°C pendant 30 min. La lecture des absorbances est effectuée au spectrophotomètre (JENWAY) à 490 nm.

Après dosage, le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml (Annexe 3).

II-3-6-Détermination des protéines (Lowry et *al.*, 1951)

La méthode de Lowry est une méthode de dosage colorimétrique des protéines, complémentaire à celle du Biuret. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin puis un second réactif dit : phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu), est ajouté. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance entre 650 et 750 nm.

Protocole

A 1 ml de l'échantillon dilué, 1 ml de la solution M (voir Annexe 4) est ajouté. Le mélange est laissé reposer 10 à 15 min à température ambiante, ensuite 3 ml du réactif de Folin est ajouté. Après agitation vigoureuse, l'échantillon est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance est lue à 750 nm.

Après dosage, le taux des protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à 500 µg/ml (Annexe 4). Ce dosage est réalisé sur les trois jus des végétaux. Chaque dosage est effectué en triple.

II-4- Sélection de milieu de base

Les jus préparés de différents substrats végétaux sont utilisés seuls (Tableau 13) ou en combinaison (Tableau 14) pour la croissance de *Lb plantarum* BH14, afin de sélectionner le milieu de base pour la suite de l'optimisation. La croissance a été estimée par un dénombrement cellulaire sur MRS solide et la mesure de pH. Le milieu MRS végétal est utilisé comme témoin.

Tableau 13 : Milieux testés de la série 1

Milieu	Composition
M1	JPC
M2	JFS
M3	JC

Tableau 14 : Milieux testés de la série 2

Milieu	Composition
M4	75% JPC + 25% JFS
M5	50% JPC+ 50% JFS
M6	25% JPS+ 75% JFS
M7	75% JPS+ 25% JC
M8	50% JPC+ 50% JC
M9	25% JPC+ 75% JC

II-5-Mise en culture et estimation de la croissance

➤ **Ensemencement des milieux de culture**

Les milieux liquides préparés sont ensemencés à raison 2% d'une culture jeune (une préculture de lactobacille dans MRS liquide à 37°C pendant 18h. Après incubation, la DO du ferment est ajustée à 0,6 à 600 nm) puis incubés à 37°C pendant 18h.

➤ **Estimation de la croissance**

La croissance du micro-organisme a été estimée par la détermination des UFC ml⁻¹ (unité formant colonie). Ce procédé consiste à faire des dilutions décimales successives dans de l'eau physiologique stérile. 1ml du milieu fermenté a été dilué dans une solution saline stérile (9g l-1 de NaCl). Des dilutions en série ont été réalisées. Un millilitre de la dilution 10⁻⁷ et 10⁻⁸ a été déposé dans le fond de la boîte de Pétri, puis 15 ml du milieu MRS gélosé maintenu en surfusion mais légèrement refroidie (à une température pour laquelle le flacon peut être tenu dans la main sans se brûler, permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse : environ 45°C) est coulé aseptiquement sur les gouttes réparties. Après homogénéisation et solidification du milieu les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 h.

Le MRS gélosé contenait 0,05 g de cystéine. Dave et Shah (1996) ont montré que l'addition de cystéine accélère la croissance de *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* (50 mg/l) ainsi que *Lb.acidophilus* (250mg/l). Cystéine est essentielle pour la biosynthèse du glutathion et des protéines telles que la thiorédoxine. Ces derniers jouent un rôle dans la résistance au stress oxydatif (Wegkamp et al, 2009).

II-6-Méthode d'optimisation

L'optimisation des milieux de cultures est réalisée en deux étapes ;

- ✓ La première étape a pour but de sélectionner les variables ayant un effet significatif sur la croissance de lactobacille en utilisant le plan de Plackett et Burman (1946).
- ✓ La deuxième étape permet de déterminer les optima des variables sélectionnés par le plan composite centré de Box et Wilson (1951).

- **Le modèle de Plackett-Burman**

Le modèle de Plackett-Burman (1946) a été utilisé dans la première partie de l'étude. C'est un moyen efficace pour la sélection des facteurs critiques : ayant un effet significatif sur la croissance de lactobacille, parmi un grand nombre de facteur en un nombre limité d'essai.

Dans cette étude, la matrice employée étudie 11 facteurs ($k=11$: 9 réels et 2 irréels) pour 12 combinaisons ($k+1$) (Tableau 16). Les facteurs réels incluent des facteurs nutritionnels (glucose, lactulose, tween80, K_2HPO_4 , acétate de sodium et $MgSO_4$) et des facteurs physiques (pH, agitation et taux d'inoculum). Chaque variable est représentée par deux niveaux; (+1) pour la valeur maximale et (-1) pour la valeur minimale (Tableau 15).

Les variables ayant un niveau de confiance $(1 - \alpha) \geq 70\%$ ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

Le modèle de Plackett-Burman est basé sur un modèle de premier ordre dont l'équation est la suivante:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon$$

\hat{Y} est la réponse expérimentale (log10 UFC/ml)

\hat{Y} la réponse expérimentale

β_0 constante

β_i coefficient de régression de la variable explicative X_i

X_i variable explicative

ε la moyenne des erreurs expérimentales

Tableau 15: Les variables utilisées dans le modèle de Plackett-Burman ainsi que leurs niveaux

Variable	unité	code	niveau	
			-1	+1
Glucose	g l ⁻¹	X ₁	0	20
Lactulose	g l ⁻¹	X ₂	0	20
Tween 80	ml l ⁻¹	X ₄	0	1
K₂HPO₄	g l ⁻¹	X ₅	0	2
acétate de sodium	g l ⁻¹	X ₆	0	5
MgSO₄	g l ⁻¹	X ₇	0	0,2
pH	/	X ₉	5,5	6,4
agitation	rpm min ⁻¹	X ₁₀	0	120
taux d'inoculation	% (v/v)	X ₁₁	1	4

Tableau 16 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 11 facteurs avec 12 combinaisons

N° d'essai	variables										
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1

*E₁ et E₂ representent les erreurs

- **Le plan composite centré de Box et Wilson :**

L'étape suivante dans la formulation des milieux est la détermination des optima des variables sélectionnés. Pour cette raison, le plan composite centré de Box et Wilson (1951) est utilisé. Les variables significatifs sélectionnés à partir le plan de Plackett et Burman de chaque souche ont été utilisé pour cette étape d'optimisation. En utilisant la méthode de CCD, les différentes combinaisons de ces variables ont été testées en 20 expériences pour *Lb plantarum* BH14, *Lb rhamnosus* et *Lb fermentum* DSM 20049, 13 expériences pour *Lb brevis* CHTD27 et *Lb farciminis* DSM 20184. Les tableaux (17-21) montrent les variables ainsi que leurs niveaux testés.

La relation entre les valeurs codées des variables entrées et ses valeurs réelles est décrite par l'équation suivante :

$$x_i = (X_i - X_{CP}) / \Delta X_i$$

où

x_i valeur codée du variable

X_i valeur réelle de ce variable

X_{CP} valeur réelle du même facteur au niveau central

ΔX_i pas entre le niveau central et les niveaux ± 1

Le plan est décrit par l'équation quadratique suivante:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$

Y la réponse (log10 UFC/ml)

b_0 la constante du modèle

b_i coefficient linéaires

b_{ii} coefficient quadratiques

b_{ij} coefficient d'interaction

x_i la forme codés du variable

Le plan composite centré permet d'exprimer les résultats sous forme d'un modèle quadratique nécessitant une analyse de la variance (ANOVA) qui donne la statistique de Fisher F . En général, pour que les prédictions soient significatives, la valeur de F observée doit être plus élevée que la valeur tabulée p .

Tableau 17 : Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de *Lb plantarum* BH14

variables	unite	code	niveau				
			-1,68179	-1	0	+1	1,68179
glucose	g l ⁻¹	X ₁	11,59	15	20	25	28,41
lactulose	g l ⁻¹	X ₂	11,59	15	20	25	28,41
MgSO ₄	g l ⁻¹	X ₃	0,06	0,10	0,15	0,20	0,23

Tableau 18 : Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de *Lb brevis* CHTD27

variables	unite	code	niveau				
			-1,41421	-1	0	+1	1,41421
Acétate de sodium	g l ⁻¹	X ₁	0,96	2,00	4,50	7,00	8,03
K ₂ HPO ₄	g l ⁻¹	X ₂	0,38	1,00	2,50	4,00	4,60

Tableau 19 : Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de *Lb rhamnosus*

variables	unite	code	niveau				
			-1,68179	-1	0	+1	1,68179
Acétate de sodium	g l ⁻¹	X ₁	0,35	0,45	0,60	0,75	0,85
MgSO ₄	g l ⁻¹	X ₂	0,06	0,10	0,15	0,20	0,23
Taux d'inoculation	%	X ₃	1,32	3,00	4,00	5,00	5,68

Tableau 20: Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de *Lb farciminis* DSM 20184

variables	unité	code	niveau				
			-1,41421	-1	0	+1	1,41421
pH	/	X ₁	4,69	5,00	5,75	6,50	6,81
taux d'inoculation	%	X ₂	0,17	1,00	3,00	5,00	5,83

Tableau 21 : Codes, unités et niveaux des variables indépendantes utilisées dans le plan composite centré de *Lb fermentum* DSM 20049

variables	unité	code	niveau				
			-1,68179	-1	0	+1	1,68179
pH	/	X_1	5,19	5,50	5,95	6,40	6,70
tween 80	ml l ⁻¹	X_2	0,32	1,00	2,00	3,00	3,68
MgSO ₄	g l ⁻¹	X_3	0,032	0,10	0,20	0,30	0,37

- **Analyse statistique**

Le logiciel Minitab 16 a été utilisé pour le traitement des données des modèles statistiques appliqués (Plackett-Burman, Box-Wilson).

Le logiciel Statistica 6.0 a été utilisé pour la représentation graphique (surface de réponse) en visualisant les interactions entre les facteurs.

- **Expérience de confirmation**

La croissance de chaque lactobacille sur le milieu approprié a été estimée afin de confirmer la validité du modèle.

II-7-Croissance sur les milieux optimisés et le milieu MRS végétal

Afin de déterminer la fiabilité des milieux élaborés, la culture de chaque lactobacille sur le milieu optimisé et le milieu MRS végétal a été réalisée.

II-8-Cinétique de croissance

Nous avons suivi la croissance des lactobacilles sur les milieux optimisés en fonction du temps. Pour cette étude les milieux sontensemencés par des cultures jeunes des souches appropriées et incubés à 37°C. La croissance est estimée par la mesure de la DO à 600 nm chaque 2h.



Résultats

I- Composition des jus végétaux

Les résultats de la détermination de la composition des trois jus végétaux préparés sont résumés dans les tableaux 22 et 23.

Tableau 22 : Composition des jus végétaux préparés

Paramètre	JPC	JFS	JC
Matière sèche (%)	41	74	62
Protéines (mg/l)	40	24	23
Sucres (mg/l)	4,94	18,08	11,08
Cendres (%)	5,00	4,70	6,00

Tableau 23 : Composition en sels minéraux

élément minéral (mg/l)	JPC	JFS	JC
Calcium	26,39	44,43	92,68
Potassium	797,43	454,62	643,61
Sodium	90,88	99,87	116,08
Magnésium	77,90	38,02	34,43
Fer	0,23	0,24	0,023
Cuivre	0,36	0,26	0,54
Manganèse	0,64	14	0,52
Zinc	1,07	0,21	0,20
Brome	0,53	1,12	0,29

Ces résultats montrent la richesse du jus de JPC en protéines et en sels minéraux précisément le magnésium, le potassium et le zinc. On remarque que la teneur en sucre est beaucoup plus élevée dans le JFS. Tandis que la composition du JC est moins riche par rapport les deux autres jus végétaux.

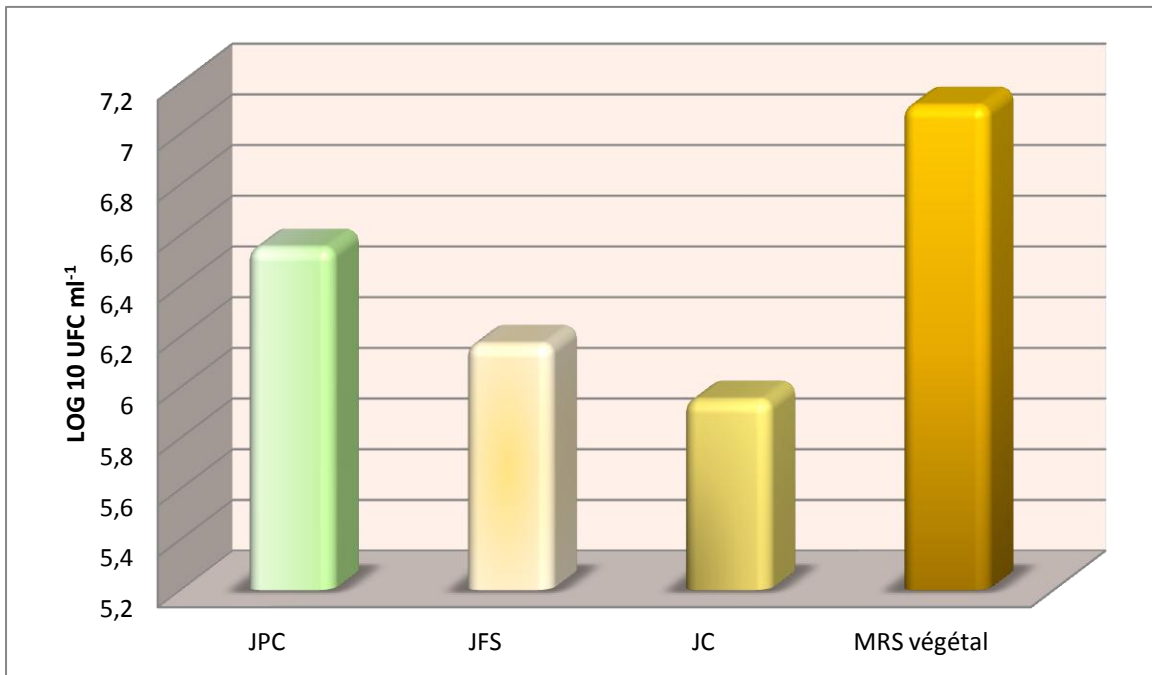


Figure 11 : Croissance de *Lb palntarum BH14* sur la première série des milieux

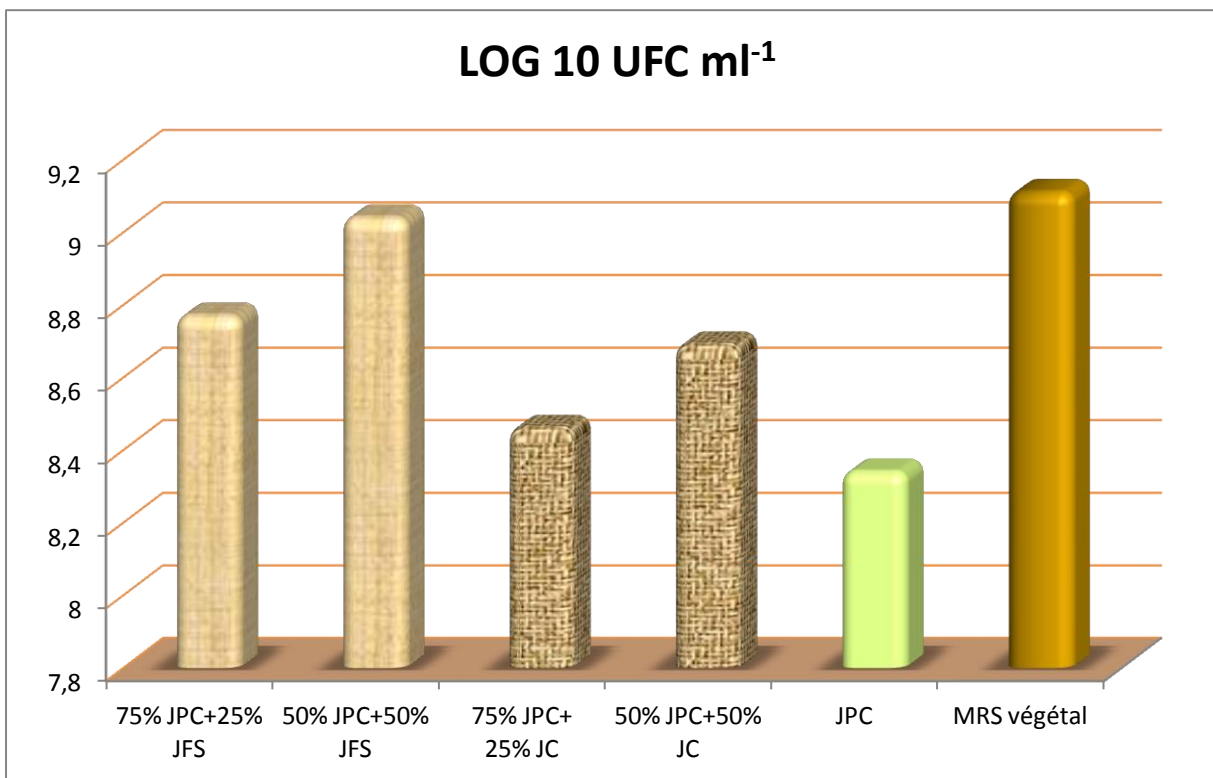


Figure 12 : Croissance de *Lb palntarum BH14* sur la deuxième série des milieux

II-La sélection de substrat de base

La figure 11 représente les résultats de la croissance de *Lb plantarum* BH14 sur les trois jus végétaux ainsi que sur le milieu MRS végétal témoin. Ils montrent que la croissance de ce lactobacille sur le milieu JPC est meilleure que sa croissance sur les milieux JFS et JC tandis que sa croissance sur le milieu témoin reste la meilleure.

Le milieu JPC est retenu dans la deuxième étape pour élaborer des milieux de culture à base des combinaisons de ce dernier avec JFS ou JC à différents pourcentages et évaluer la croissance de *Lb plantarum* BH14 sur ces milieux. Les résultats de cette étude représentés dans la figure 12 montrent clairement que la meilleure croissance ($9,04 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$) était sur le milieu constitué de 50% JPC + 50% JFS. Cette croissance est proche à celle obtenue sur le milieu témoin ($9,11 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$). D'autre part, les combinaisons des jus végétaux ont amélioré la production de la biomasse en comparant avec celle obtenue sur JPC seul $8,34 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$.

La combinaison de JPC et JFS quelque soit le pourcentage semble la bonne par rapport la combinaison de JPC et JC ; on note une croissance de $8,77 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$, $9,04 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$ sur les milieux 75% JPC+25% JFS , 50% JPC+ 50% JFS respectivement, tandis que la croissance sur les milieux 75% JPC+ 25%JC et 50% JPC+50% JC était $8,46 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$, $8,69 \log 10 \text{ UFC ml}^{-1}$ respectivement

Alors, la combinaison 50% JPC + 50% JFS a été sélectionnée et utilisée comme milieu de base (**JPF**) pour la suite de l'étude.

III-Optimisation

III-1- *Lb plantarum* BH14

- **Sélection des facteurs**

Neufs variable ont été testés (glucose, lactulose, tween 80, K₂HPO₄, acétate de sodium, MgSO₄, pH, agitation et taux d'inoculation) pour déterminer leurs effets sur la croissance de cinq lactobacilles sur des milieux de culture à base de JPF par l'utilisation du plan Plackett-Burman. Ce plan est un moyen efficace pour dépister les facteurs critiques parmi un grand nombre de variables avec un nombre minimal d'expériences. L'analyse statistique et la modélisation des résultats ont permis de mesurer l'effet de chaque facteur et son niveau de signification sur la croissance. Le tableau 24 représente les résultats de la réponse (log 10UFC ml⁻¹) pour chaque expérience. En effet, ces données montrent une variation de la réponse de 8,57 à 10,16 log10 UFC ml⁻¹. Ce qui montre la nécessité de l'optimisation du milieu de culture afin d'atteindre une meilleure croissance.

Tableau 24 : Résultats de la croissance de *Lb plantarum* BH14 selon le plan de Plackett-Burman

expérience	variables indépendantes											Réponse log10 UFC ml ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *	
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1	9,38
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1	9,74
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1	8,57
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1	9,38
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1	10,16
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1	9,76
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1	9,54
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1	9,39
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1	8,67
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1	9,48
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1	9,48
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1	9,00

*E₁ et E₂ représentent les erreurs.

Tableau 25 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lb plantarum* BH14

variable	Effet	Coef	SE Coef	t	p
glucose	0,5417	0,2708	0,08021	3,38	0,078
lactulose	0,3250	0,1625	0,08021	2,03	0,180
tween 80	-0,0850	-0,0425	0,08021	-0,53	0,649
K ₂ HPO ₄	0,2017	0,1008	0,08021	1,26	0,336
acetate de sodium	0,0117	0,0058	0,08021	0,07	0,949
MgSO ₄	0,3850	0,1925	0,08021	2,40	0,138
pH	0,0483	0,0242	0,08021	0,30	0,792
agitation	-0,2983	-0,1492	0,08021	-1,86	0,204
taux d'inoculation	0,0783	0,0392	0,08021	0,49	0,674

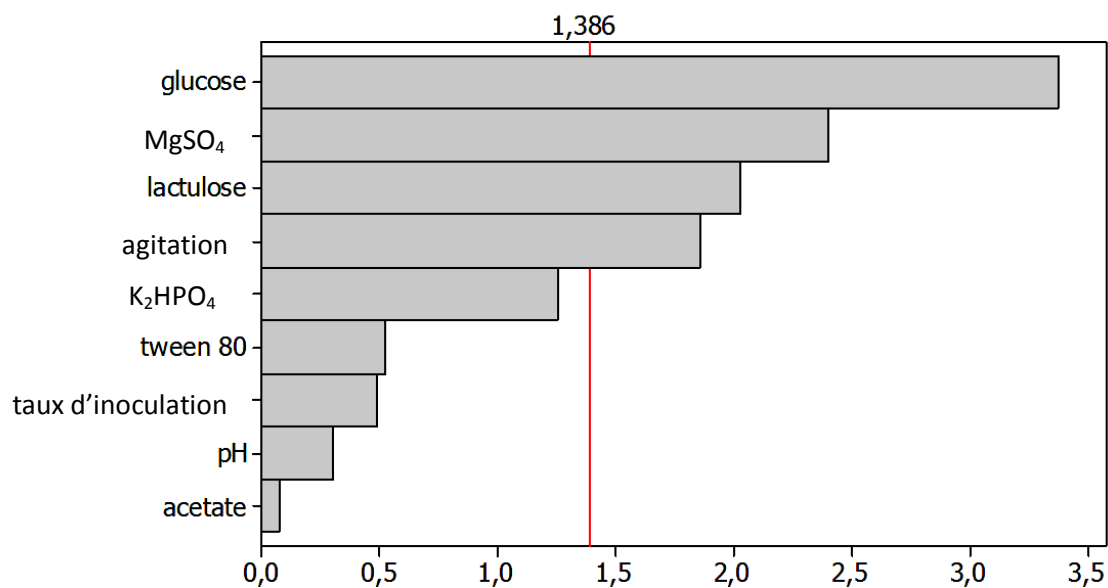


Figure 13: Diagramme de Pareto pour la croissance de *Lb plantarum* BH14

Les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le logiciel MINITAB 16. Les facteurs ayant une valeur de P inférieur à 0,3 ont été considérés comme ayant un effet significatif et sont donc retenus pour la suite de l'optimisation. Les données du tableau 25 et la figure 13 ont permis de classer les neuf facteurs en deux types :

- Les éléments éliminés : des facteurs non significatifs, ayant un intervalle de confiance $(1 - \alpha) \leq 70\%$ (tween 80, K_2HPO_4 , acétate de sodium, pH et taux d'inoculation).
- Les éléments à optimiser : les facteurs ayant un effet significatif possèdent un intervalle de confiance $(1 - \alpha) \geq 70\%$ (glucose, lactulose, $MgSO_4$).

• Détermination des optima

Tableau 26: Résultats de la croissance de *Lb plantarum* BH14 selon le plan de Box et Wilson

expérience	X_1 glucose	X_2 lactulose	X_3 MgSO ₄	log10 UFC ml ⁻¹
1	20	11,5910	0,150000	8,45
2	20	20,0000	0,150000	8,30
3	20	20,0000	0,150000	8,59
4	20	20,0000	0,234090	8,31
5	25	15,0000	0,100000	8,46
6	20	20,0000	0,150000	8,22
7	25	25,0000	0,200000	8,30
8	20	20,0000	0,150000	8,29
9	20	20,0000	0,150000	8,39
10	15	25,0000	0,100000	8,35
11	25	15,0000	0,200000	8,31
12	25	25,0000	0,100000	8,25
13	20	28,4090	0,150000	8,29
14	20	20,0000	0,150000	8,30
15	15	15,0000	0,100000	8,24
16	20	11,5910	0,150000	8,11
17	20	20,0000	0,150000	8,40
18	20	20,0000	0,150000	8,32
19	20	20,0000	0,234090	8,30
20	25	15,0000	0,100000	8,17

Tableau 27 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lb plantarum* BH14

Terme	Coefficient	<i>T</i>	<i>P</i>
constant	8,29873	588,022	0,000
X₁	- 0,04287	- 4,578	0,001
X₂	0,02183	2,332	0,042
X₃	0,02939	3,139	0,011
X₁²	0,02625	2,880	0,016
X₂²	-0,01264	-1,387	0,196
X₃²	0,01387	1,522	0,159
X₁X₂	0,03125	2,554	0,029
X₁X₃	- 0,12875	-10,524	0,000
X₂X₃	- 0,01375	-1,124	0,287

Tableau 28: Analyse de variance pour *Lb plantarum* BH14

Source	DL	SS séq	Som Car ajust	C ajust	F	p
Régression	9	0,201001	0,201001	0,022333	18,65	0,000
Linéaire	3	0,043403	0,043403	0,014468	12,08	0,001
Carré	3	0,015660	0,015660	0,005220	4,36	0,033
Intéraction	3	0,141938	0,141938	0,047313	39,51	0,000
Erreur résiduelle	10	0,011974	0,011974	0,001197		
Inadéquation de l'ajustement	5	0,011691	0,011691	0,002338	41,26	0,000
Erreur pure	5	0,000283	0,000283	0,000057		
Total	19	0,212975				

DL : Degrés de liberté, SS séq; somme carée, Som Car ajust : somme carée ajustée, CM ajust : carrée moyenne ajustées, F : rapport des variances, p : probabilité

Le modèle statistique de Box et Wilson a été appliqué sur les facteurs sélectionnés afin de déterminer leurs optima. Le tableau 26 montre les expériences réalisées selon ce plan ainsi que les réponses obtenues. La meilleure croissance était 8,59 log₁₀ UFC ml⁻¹, obtenue à partir de la combinaison 3: 20 g l⁻¹ de glucose, 20 g l⁻¹ lactulose et 0,15 g l⁻¹ MgSO₄.

La croissance de *Lb plantarum* BH14 en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y = 8,29873 - 0,04287X_1 + 0,02183X_2 + 0,02939X_3 + 0,02625X_1^2 - 0,01264X_2^2 + 0,01387X_3^2 + 0,03125X_1X_2 - 0,12875X_1X_3 - 0,01375X_2X_3 \quad (1)$$

Où :

Y est la réponse (log 10 UFC ml⁻¹)

X₁, X₂ et X₃ sont glucose, lactulose et MgSO₄ respectivement

En effet, La valeur de la probabilité P a été obtenue afin de déterminer l'effet significatif de chaque paramètre. Plus la valeur de P est petite, plus le coefficient du paramètre est significatif. Nos résultats ont montré que l' effet du glucose (X₁), lactulose (X₂) et MgSO₄ (X₃) sur le nombre de cellules de *Lb plantarum* BH14 était significatif (P<0,05) (Tableau 27).

En outre, le coefficient quadratique X_1^2 et les coefficients d'interaction X_1X_2 , X_1X_3 sont également significatifs sur la croissance de la souche. L'équation 1 a été réduite à l'équation 2 suivante :

$$Y = 8,29873 - 0,04287X_1 + 0,02183X_2 + 0,02939X_3 + 0,02625X_1^2 + 0,03125X_1X_2 - 0,12875X_1X_3 \quad (2)$$

L'analyse de variance pour la réponse (\log_{10} UFC ml^{-1}) a été faite par MINITAB 16 (Tableau 28). L'équation de régression obtenue à partir de l'analyse de variance ANOVA a montré que la valeur de R^2 (coefficient de corrélation multiple) était 0,9438 (une valeur $> 0,75$ indique la validité du modèle et pour un bon modèle statistique, la valeur de R^2 devrait être la plus proche possible de 1). Cela veut dire que le modèle est capable d'expliquer 95% de la variation de la réponse. En outre, la valeur de P et de l'inadéquation de l'ajustement est très faible (0,000) ce qui montre une signification très élevée pour le modèle de régression. Cela confirme aussi la forte corrélation existant entre la croissance de *Lb plantarum* BH14 et les facteurs sélectionnés.

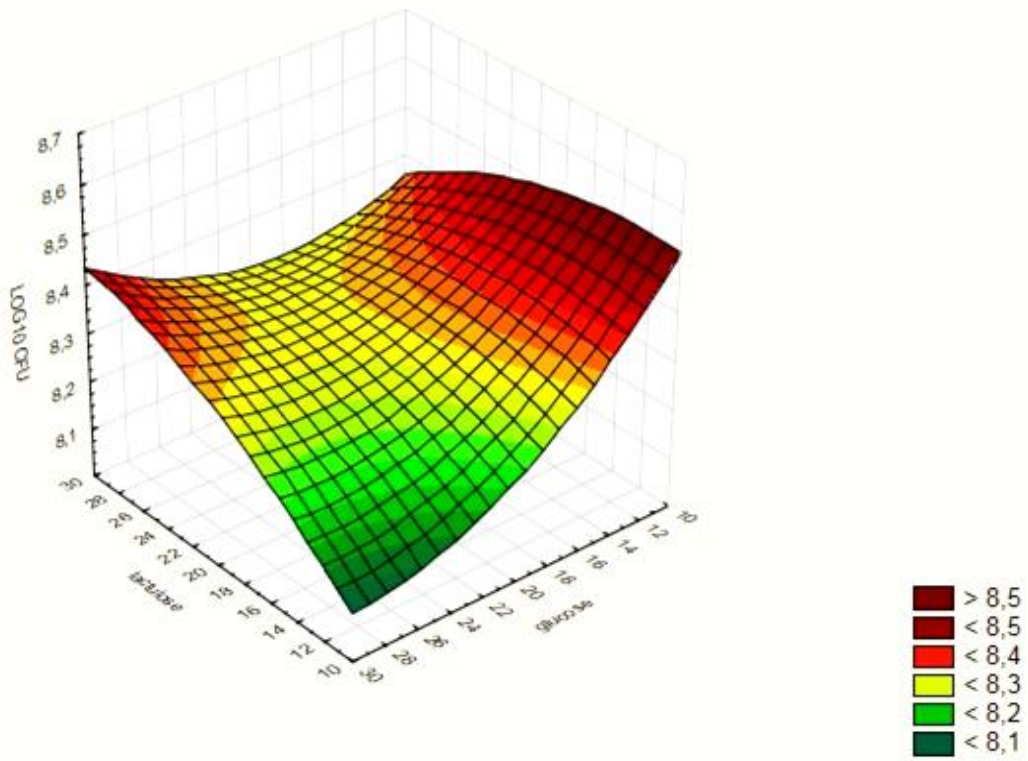


Figure 14 a: Surface de réponses de la croissance de *Lb plantarum* BH14 en fonction de glucose et lactulose

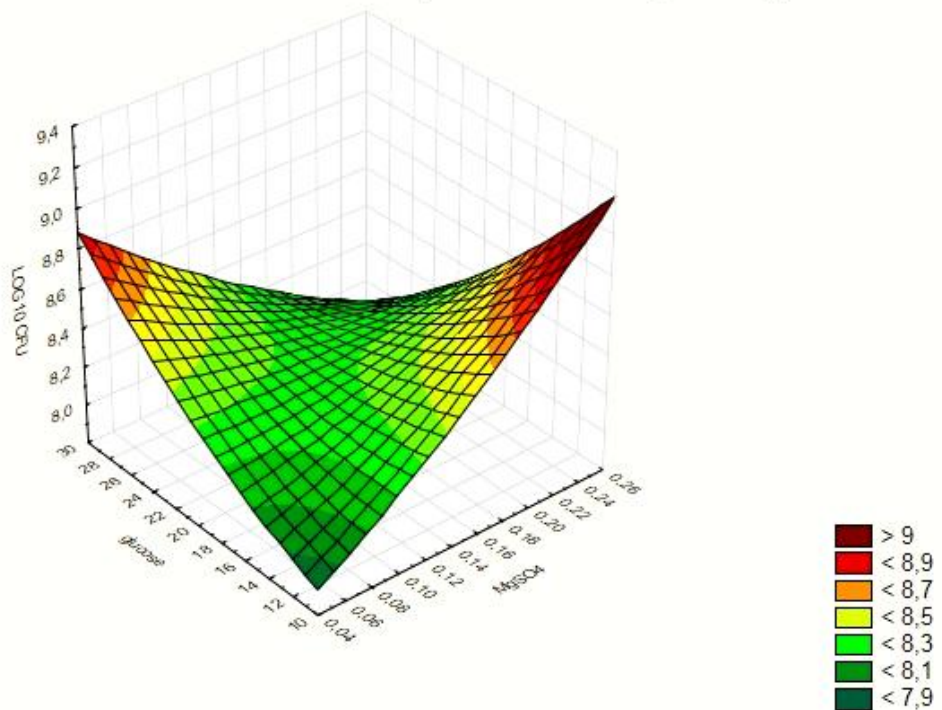


Figure 14b: Surface de réponse de la croissance de *Lb plantarum* BH14 en fonction de glucose et MgSO₄

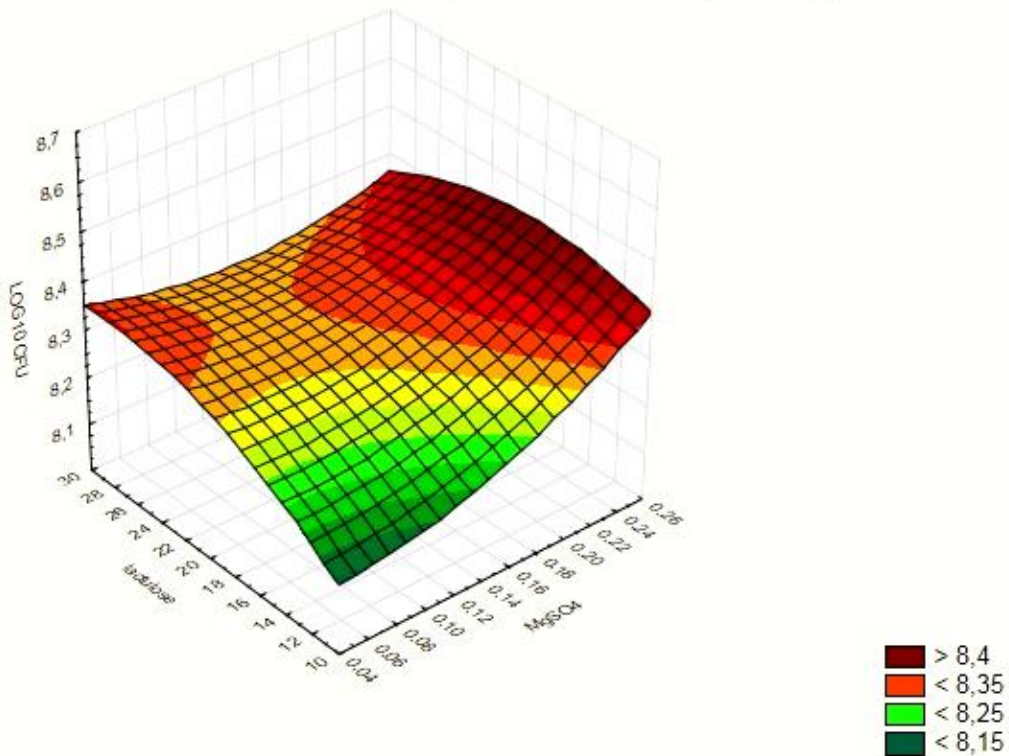


Figure 14c : Surface de réponse de la croissance de *Lb plantarum* BH14 en fonction du MgSO₄ et lactulose

La représentation graphique de la surface de réponse indiquée dans les figures 14a, 14b et 14c permet à comprendre l'effet de glucose, lactulose et MgSO₄ sur la croissance cellulaire, visualiser leurs interactions réciproques et localiser le niveau optimal de chaque variable pour une réponse maximale. Ces représentations graphiques ont été construites en traçant la réponse ($\log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$) sur l'axe Z et les deux variables indépendantes sur les deux axes : X et Y, tout en conservant les autres variables à leurs niveaux optimaux.

La figure 14a représente l'effet de glucose et lactulose ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance cellulaire. Elle montre que la diminution de la concentration de glucose et lactulose peut augmenter la croissance de *Lb plantarum* BH14.

La figure 14b représente l'effet de glucose et MgSO₄ ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance cellulaire et montre que la réponse ($\log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$) a varié de façon significative lorsque la concentration de glucose a augmenté et la concentration du MgSO₄ a diminué.

La figure 14c explique que la croissance cellulaire maximale a été obtenue à un niveau élevé de MgSO₄ et un niveau intermédiaire de lactulose.

Une formulation optimisée a été suggéré par le logiciel (Figure 15) aux concentrations suivantes: 11,59 g l⁻¹ de glucose, 11,59 g l⁻¹ lactulose et 0,23 g l⁻¹ MgSO₄.

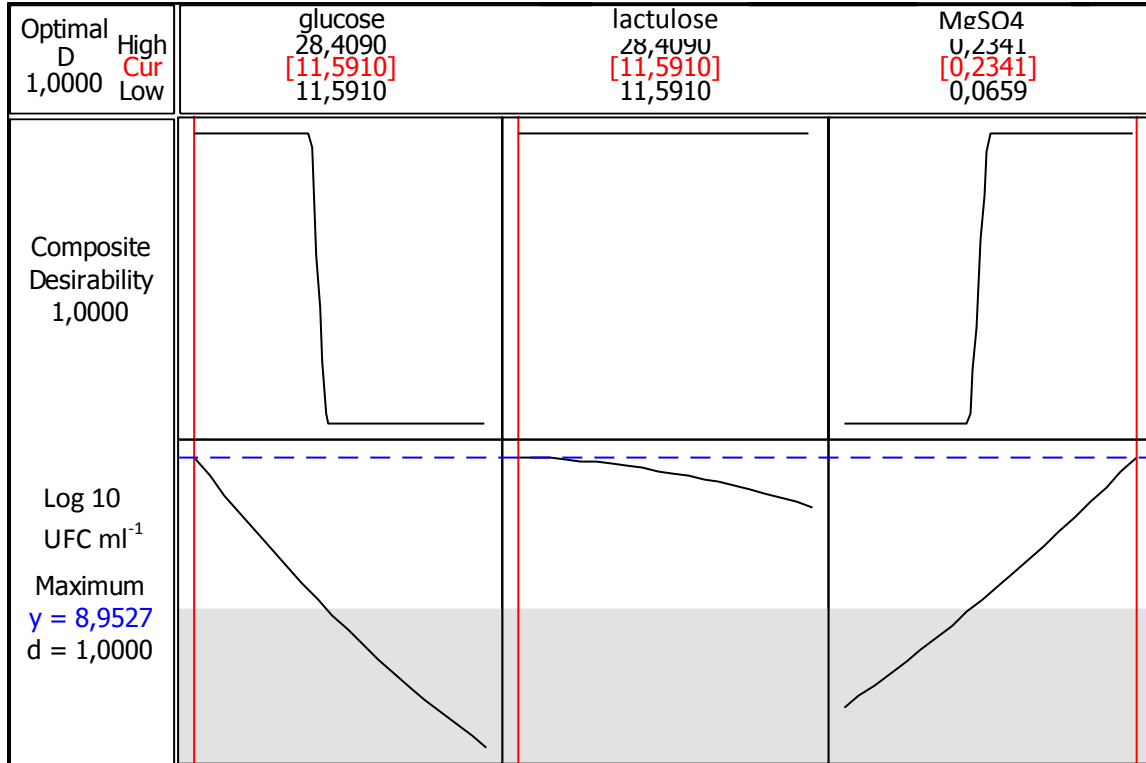


Figure 15 : Les optima des facteurs sélectionnés pour *Lb plantarum* BH14

III-2- *Lb brevis* CHTD27

• **Sélection des facteurs**

La réponse pour la croissance (\log_{10} UFC ml^{-1}) a montré une hétérogénéité des résultats, qui prouve l'importance de l'impact de certains facteurs. En effet, elle a changé clairement avec divers niveaux des variables dans une gamme de 9,11 à 11,00 \log_{10} UFC ml^{-1} (Tableau 29). Cette variation reflète l'importance de l'optimisation pour atteindre une croissance plus élevée.

Tableau 29 : Résultats de la croissance de *Lb brevis* CHTD27 selon le plan de Plackett-Burman

expérience	variables indépendantes											Réponse \log_{10} UFC ml^{-1}
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *	
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1	9,35
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1	9,11
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1	9,38
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1	10,30
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1	9,70
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1	9,72
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1	11,00
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1	9,12
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1	10,69
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1	9,34
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1	9,45
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1	9,64

*E₁ et E₂ représentent les erreurs.

Le tableau 30 et la figure 16 montrent que parmi les facteurs ayant un effet significatif sur la croissance de *Lb brevis* CHTD27: K_2HPO_4 , acétate de sodium. Ils ont été pris en considération dans le prochain processus d'optimisation. Tandis que, le glucose, le pH et le taux d'inoculation influent négativement la croissance de *Lb brevis* CHTD27. Le reste des facteurs : lactulose, tween80, $MgSO_4$ et l'agitation n'ont pas d'effet significatif sur la croissance du lactobacille d'intérêt ($P > 0,3$). Ces facteurs ont été éliminés dans l'étape suivante de l'étude.

Tableau 30 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lb brevis* CHTD27

variable	Effet	Coef	SE Coef	t	p
glucose	-0,0293	-0,0147	0,00767	-1,91	0,196
lactulose	-0,0013	-0,0007	0,00767	-0,09	0,939
tween 80	0,3133	0,1567	0,15337	1,02	0,414
K_2HPO_4	0,5067	0,2533	0,07668	3,30	0,081
acetate de sodium	0,2800	0,1400	0,03067	4,56	0,045
$MgSO_4$	-1,4667	-0,7333	0,76685	-0,96	0,440
pH	-0,7111	-0,3556	0,17041	-2,09	0,172
agitation	0,0026	0,0013	0,00128	1,02	0,414
taux d'inoculation	-0,3778	-0,1889	0,05112	-3,69	0,066

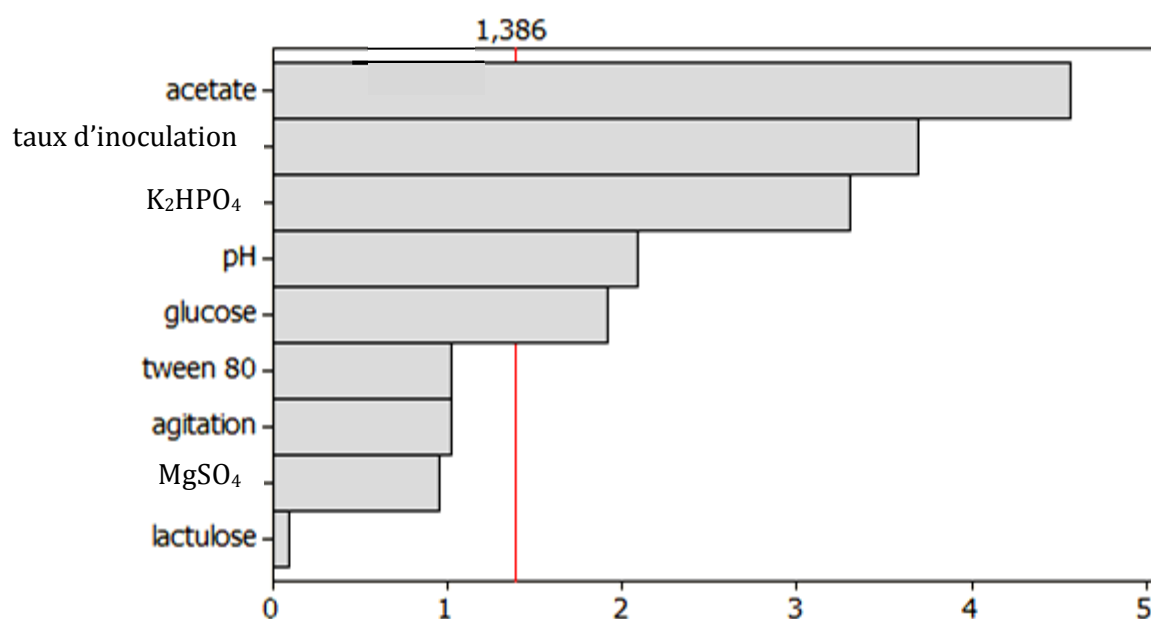


Figure 16: Diagramme de Pareto pour la croissance de *Lb brevis* CHTD27

• **Détermination des optima :**

En appliquant le plan de Box et Wilson sur ces deux facteurs sélectionnés, une matrice de 13 expériences a été obtenue. Le tableau 31 montre les expériences réalisées selon ce plan ainsi que les réponses correspondantes. La plus forte croissance était 11,00 log₁₀ UFC ml⁻¹, obtenue à partir de la combinaison 8: 7 g l⁻¹ d'acétate de sodium et 1 g l⁻¹ de K₂HPO₄.

Tableau 31 : Résultats de la croissance de *Lb brevis* CHTD27 selon le plan de Box et Wilson

	X_1	X_2	log ₁₀
expérience	Acétate	K ₂ HPO ₄	UFC ml ⁻¹
	g/l	g/l	
1	4,50000	2,50000	9,66
2	8,03553	2,50000	10,70
3	4,50000	2,50000	9,70
4	2,00000	4,00000	10,95
5	4,50000	2,50000	9,64
6	2,00000	1,00000	10,57
7	7,00000	4,00000	9,90
8	7,00000	1,00000	11,00
9	4,50000	4,62132	10,60
10	0,96447	2,50000	10,67
11	4,50000	2,50000	9,65
12	4,50000	0,37868	10,69
13	4,50000	2,50000	9,66

La croissance de *Lb brevis* en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y = 9,66200 - 0,07220 X_1 - 0,10591 X_2 + 0,49650 X_1^2 + 0,47650 X_2^2 + 0,37000 X_1X_2 \quad (3)$$

Où :

Y est la réponse (log 10 UFC ml⁻¹)

X₁, X₂ sont acétate de sodium et K₂HPO₄ respectivement

D'après les résultats du tableau 32, on peut conclure que le coefficient linéaire X₂ (K₂HPO₄), les coefficients quadratiques : X₁² (acétate de sodium × acétate de sodium) et X₂² (K₂HPO₄ × K₂HPO₄) et le coefficient d'interaction X₁X₂ (acétate de sodium × K₂HPO₄) sont significatifs (P < 0,05). Alors l'équation 3 est réduite à l'équation 4 suivante :

$$Y = 9,66200 - 0,10591 X_2 + 0,49650 X_1^2 + 0,47650 X_2^2 + 0,37000 X_1X_2 \quad (4)$$

Tableau 32: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lb brevis*

Terme	coefficient	T	P
constant	9,66200	173,899	0,000
X ₁	-0,07220	-1,644	0,144
X ₂	-0,10591	-2,411	0,047
X ₁ ²	0,49650	10,540	0,000
X ₂ ²	0,47650	10,116	0,000
X ₁ X ₂	-0,37000	-5,956	0,001

Tableau 33 : Analyse de variance pour *Lb brevis* CHTD27

Source	DL	SS séq	Som Car ajust	CM ajust	F	<i>p</i>
Régression	5	3,59365	3,59365	0,71873	46,56	0,000
Linéaire	2	0,13143	0,13143	0,06572	4,26	0,062
Carré	2	2,91461	2,91461	1,45731	94,41	0,000
Intéraction	1	0,54760	0,54760	0,54760	35,48	0,001
Erreur résiduelle	7	0,10805	0,10805	0,01544		
Inadéquation de l'ajustement	3	0,10597	0,10597	0,03532	67,93	0,001
Erreur pure	4	0,00208	0,00208	0,00052		
Total	12	3,70169				

DL : Degrés de liberté, SS séq; somme carée, Som Car ajust : somme carée ajustée, CM ajust : carrée moyenne ajustées, F : rapport des variances, *p* : probabilité

Il existe une forte corrélation entre la croissance de *Lb brevis* et les facteurs sélectionnés (acétate de sodium et K_2HPO_4) basé sur l'équation de régression obtenue à partir d'ANOVA qui montre que la valeur du R^2 est 0,9708 donc le modèle peut expliquer des variations totales de la réponse à 97 %. La valeur du R^2 ajusté est élevée 0,95 et proche à 1. D'autre part, le modèle choisi est représentatif du système car la valeur du *P* est très faible 0,000 ainsi que la valeur de l'inadéquation du modèle 0,001 (Tableau 33). Cela suggère que les données expérimentales obtenues ont été ajustées avec précision par le modèle.

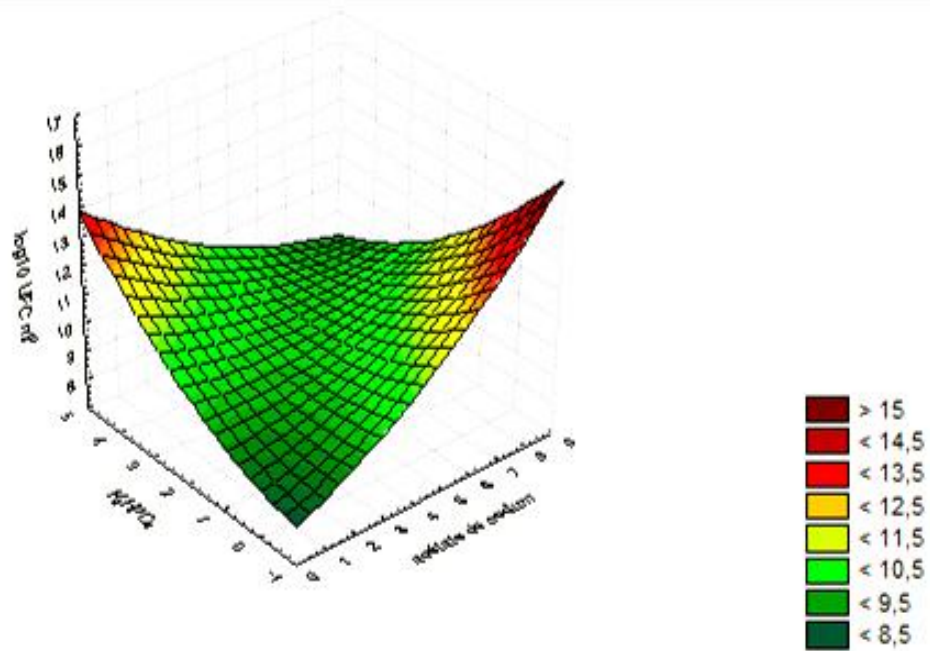


Figure 17 : Surface de réponse de la croissance de *Lb brevis* CHTD27 en fonction du K_2HPO_4 et acétate de sodium

La représentation graphique (Figure 17) montre que la croissance est maximale lorsque l'un des deux facteurs est à son niveau supérieur alors que l'autre est à son niveau minimal et l'inverse. Les valeurs optimales de ces deux facteurs suggérés par le logiciel (Figure 18) sont : 8,03g/l d'acétate de sodium et 1,68g/l de K_2HPO_4 .

New D 1,0000	High Cur Low	ACETATE 8,0355 [8,0355] 0,9645	K_2HPO_4 4,6213 [1,6868] 0,3787
Composite Desirability 1,0000			
Log 10 UFC ml ⁻¹ Maximum y = 11,0341 d = 1,0000			

Figure 18: Les optima des facteurs sélectionnés pour *Lb brevis* CHTD27

III-4- *Lb rhamnosus*

- **Sélection des facteurs**

Il ressort des résultats du tableau 34 que l'expérience 11 a donnée une meilleure croissance de *Lb rhamnosus* : 10,33 log₁₀ UFC ml⁻¹.

Tableau 34: Résultats de la croissance de *Lb rhamnosus* selon le plan de Plackett-Burman

expérience	variables indépendantes											Réponse log ₁₀ UFC ml ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *	
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1	9,15
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1	8,60
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1	9,25
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1	9,37
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1	8,78
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1	9,00
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1	9,34
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1	9,00
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1	8,23
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1	9,80
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1	10,33
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1	8,39

*E₁ et E₂ représentent les erreurs.

Trois variables qui sont l'acétate de sodium, le $MgSO_4$ et le taux d'inoculation sur 9 variables testées se sont démontrées significatives ($P < 0,3$) (Tableau 35 et Figure 19), impliquant que ces variables ont influencé la croissance de *Lb rhamnosus*. Tandis que K_2HPO_4 a un effet négatif sur la croissance de ce lactobacille. Les variables restantes, glucose, lactulose, tween80, pH et agitation se sont avérées insignifiantes sur cette même réponse.

Tableau 35 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lb rhamnosus*

variable	Effet	Coef	SE Coef	t	p
glucose	0,0027	0,0013	0,00877	0,15	0,893
lactulose	0,0227	0,0113	0,00877	1,29	0,325
tween 80	0,3267	0,1633	0,17539	0,93	0,450
K_2HPO_4	-0,4333	-0,2167	0,08769	-2,47	0,132
acétate de sodium	0,1933	0,0967	0,03508	2,76	0,110
$MgSO_4$	5,9333	2,9667	0,87694	3,38	0,077
pH	-0,2296	-0,1148	0,19488	-0,59	0,615
agitation	-0,0014	-0,0007	0,00146	-0,48	0,682
taux d'inoculation	0,3844	0,1922	0,05846	3,29	0,081

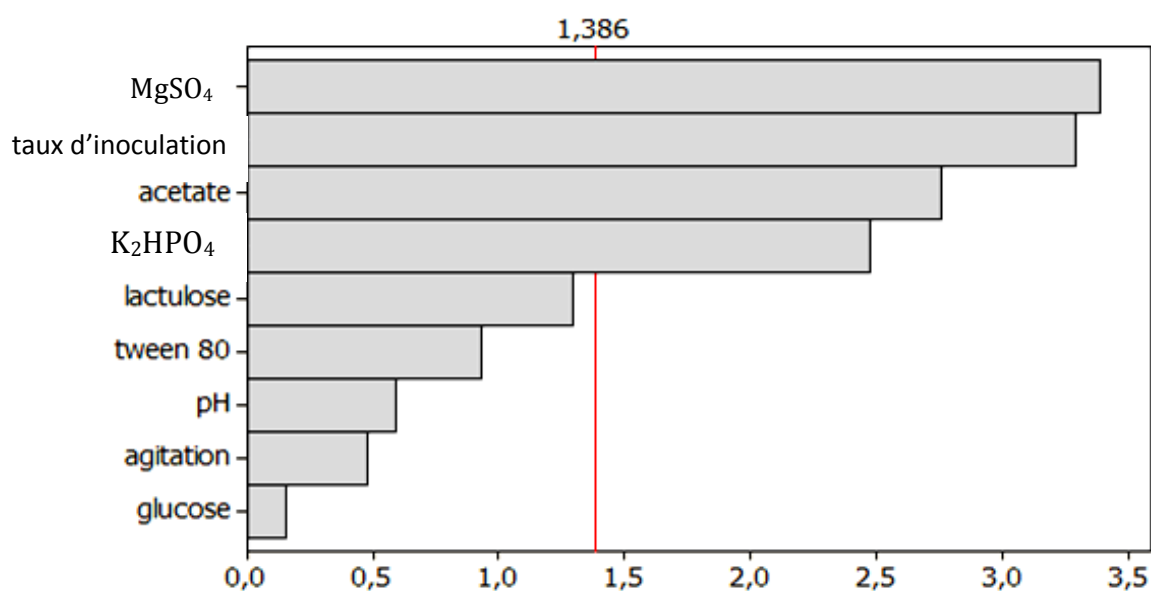


Figure 19 : Diagramme de Pareto pour la croissance de *Lb rhamnosus*

• **Détermination des optima**

En appliquant le plan de Box et Wilson sur ces trois facteurs sélectionnés, une matrice de 20 expériences a été obtenue. Le tableau 36 montre les expériences réalisées selon ce plan ainsi que les réponses correspondantes. Une croissance maximale était 9,80 log₁₀ UFC ml⁻¹, obtenue à partir de la combinaison 10: 0,75 g l⁻¹ d'acétate de sodium et 0,1 g l⁻¹ MgSO₄ et un taux d'inoculation de 3,00 %.

Tableau 36 : Résultats de la croissance de *Lb rhamnosus* selon le plan de Box et Wilson

expérience	X ₁ acétate	X ₂ MgSO ₄	X ₃ taux d'inoculation	log ₁₀ UFC ml ⁻¹
1	0,35	0,150000	4,00	8,91
2	0,60	0,150000	1,32	9,16
3	0,45	0,100000	5,00	8,79
4	0,85	0,150000	4,00	8,90
5	0,45	0,200000	5,00	9,29
6	0,60	0,065910	4,00	9,25
7	0,60	0,150000	4,00	8,74
8	0,60	0,150000	4,00	8,73
9	0,60	0,150000	5,68	9,10
10	0,75	0,100000	3,00	9,80
11	0,60	0,150000	4,00	8,73
12	0,75	0,200000	5,00	8,71
13	0,60	0,150000	4,00	8,75
14	0,60	0,150000	4,00	8,74
15	0,45	0,200000	3,00	8,69
16	0,75	0,100000	5,00	9,34
17	0,75	0,200000	3,00	8,56
18	0,60	0,234090	4,00	8,69
19	0,60	0,150000	4,00	8,73
20	0,45	0,100000	3,00	8,55

La croissance de *Lb rhamnosus* en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y = 7,0850 + 7,4028 X_1 + 2,3176X_2 - 0,3998 X_3 + 2,6945 X_1^2 + 33,0062 X_2^2 + 0,0850 X_3^2 - 41,8333X_1X_2 - 0,9583X_1X_3 + 2,4250 X_2X_3 \quad (5)$$

Où :

Y est la réponse (log 10 UFC ml⁻¹)

X₁, X₂ et X₃ sont l'acétate de sodium, le MgSO₄ et le taux d'inoculation respectivement.

D'après les résultats du tableau 37, on peut conclure que le coefficient linéaire X₁ (acétate de sodium), les coefficients quadratiques : X₁² (acétate de sodium × acétate de sodium), X₂² (MgSO₄ × MgSO₄) et X₃² (taux d'inoculation × taux d'inoculation), les coefficients d'interaction : X₁X₂ (acétate de sodium × MgSO₄), X₁X₃ (acétate de sodium × taux d'inoculation) et X₂X₃ (MgSO₄ × taux d'inoculation) sont significatifs (P < 0,05). Alors, l'équation 5 est réduite à l'équation 6 suivante :

$$Y = 9,66200 - 0,10591 X_2 + 0,49650 X_1^2 + 0,47650 X_2^2 + 0,37000 X_1X_2 \quad (6)$$

Tableau 37: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lb rhamnosus*

Terme	Coefficient	T	P
constant	7,0850	8,187	0,000
X ₁	7,4028	4,653	0,001
X ₂	2,3176	0,529	0,608
X ₃	-0,3998	-2,206	0,052
X ₁ X ₁	2,6945	2,638	0,025
X ₂ X ₂	33,0062	3,643	0,005
X ₃ X ₃	0,0850	6,232	0,000
X ₁ X ₂	-41,8333	-10,431	0,000
X ₁ X ₃	-0,9583	-4,779	0,001
X ₂ X ₃	2,4250	4,031	0,002

ANOVA démontre que le modèle est hautement significatif d'après la faible valeur du P et celle de l'inadéquation de l'ajustement (Tableau 38). En outre, la valeur élevée du R² (0,96) et celle du R² ajusté (0,9284) confirme aussi la forte corrélation existant entre la croissance de *Lb rhamnosus* et les facteurs sélectionnés.

La représentation graphique (Figures 20a, 20b et 20c) montre l'effet important d'acétate de sodium. On peut observer que des concentrations élevées de ce dernier augmentent la croissance de *Lb rhamnosus*. La figure 21 présente les optima ainsi que la croissance estimée.

Tableau 38 : Analyse de variance pour *Lb rhamnosus*

Source	DL	SS séq	Som Car ajust	CM ajust	F	<i>p</i>
Régression	9	1,84714	1,84714	0,205237	28,35	0,000
Linéaire	3	0,43211	0,30542	0,101805	14,06	0,001
Carré	3	0,34459	0,34459	0,114863	15,87	0,000
Intéraction	3	1,07044	1,07044	0,356812	49,29	0,000
Erreur résiduelle	10	0,07238	0,07238	0,007238		
Inadéquation de l'ajustement	5	0,07205	0,07205	0,014410	216,15	0,000
Erreur pure	5	0,00033	0,00033	0,000067		
Total	19	1,91952				

DL : Degrés de liberté, SS séq; somme carée, Som Car ajust : somme carée ajustée, CM ajust : carrée moyenne ajustées, F : rapport des variances, *p* : probabilité

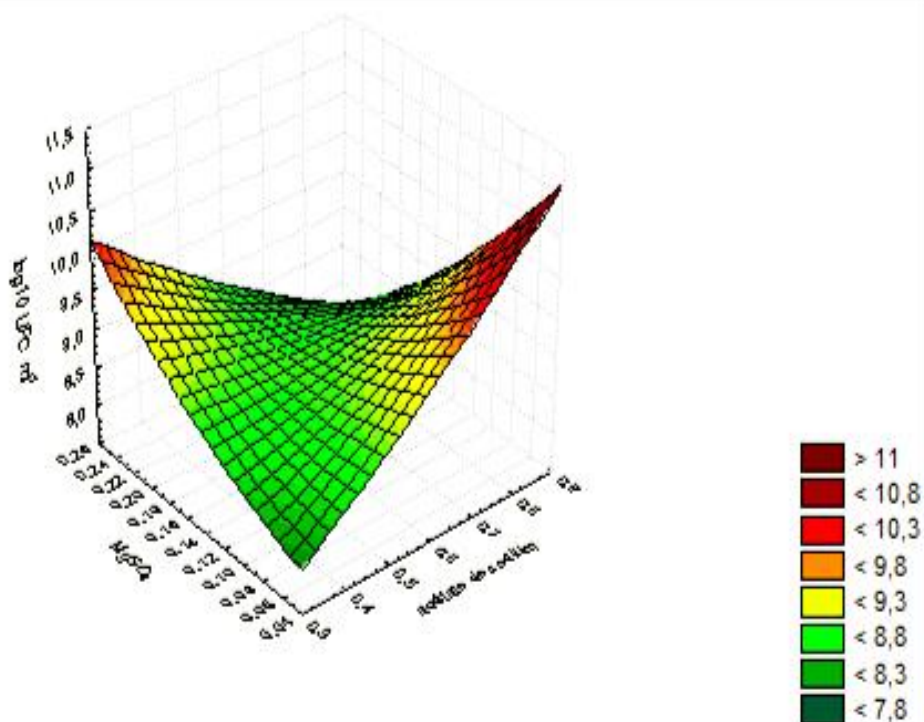


Figure 20 a : surface de réponse de la croissance de *Lb rhamnosus* en fonction du $MgSO_4$ et acétate de sodium

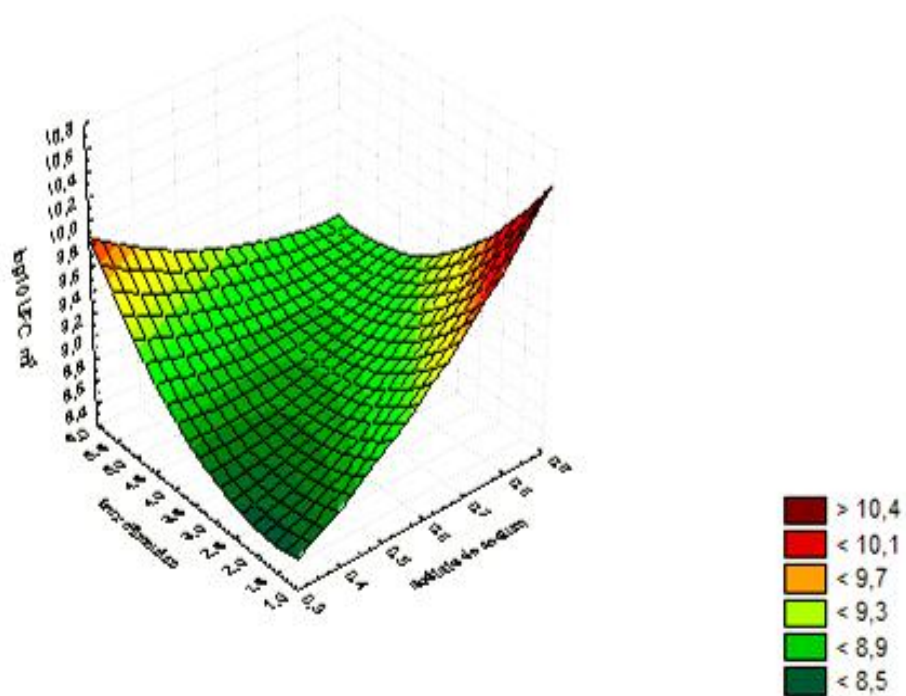


Figure 20 b : Surface de réponse de la croissance de *Lb rhamnosus* en fonction du taux d'inoculation et l'acétate de sodium

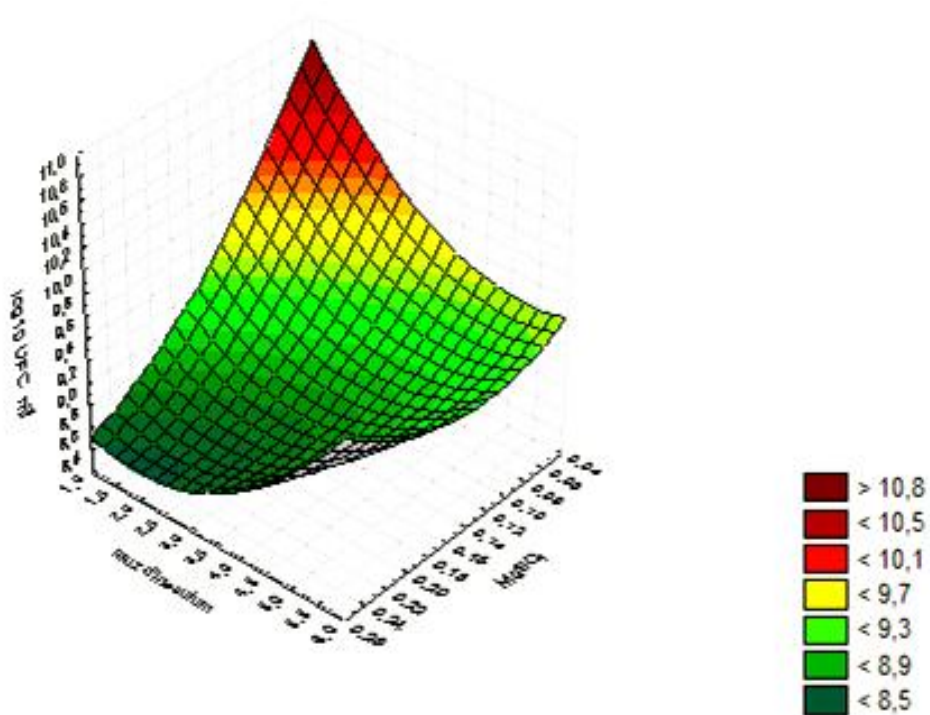


Figure 20c : Surface de réponse de la croissance de *Lb rhamnosus* en fonction du MgSO₄ et le taux d'inoculation

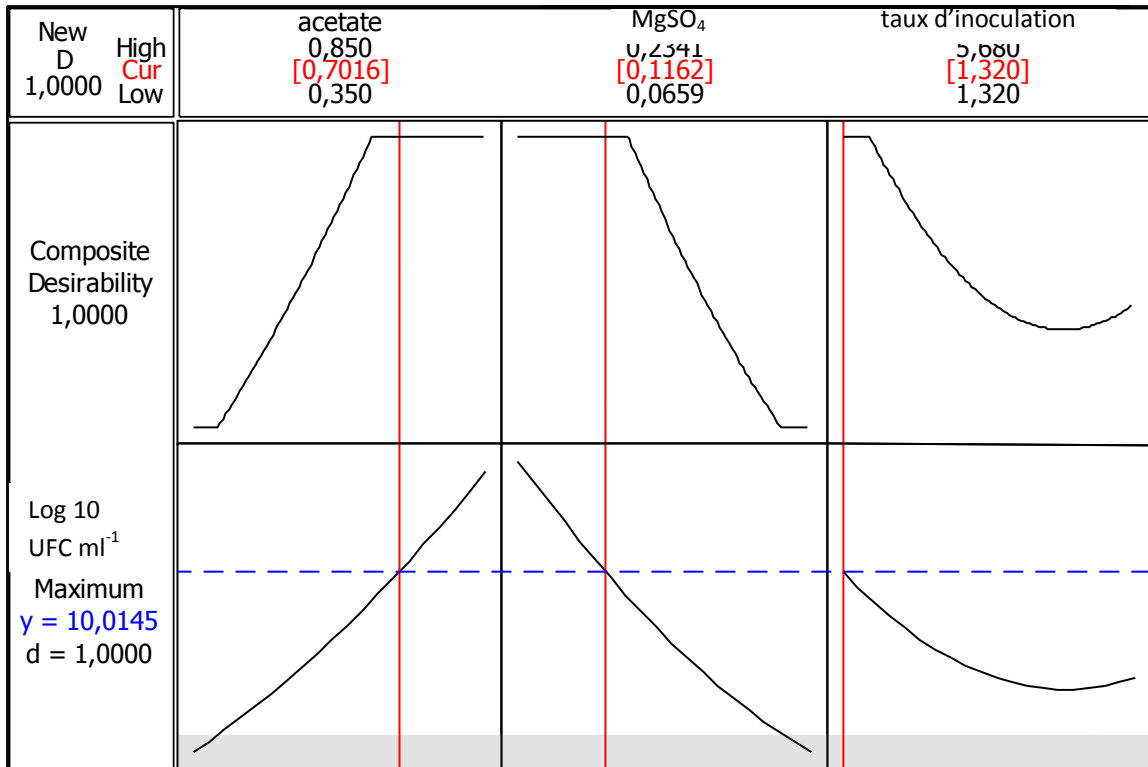


Figure 21 : Les optima des facteurs sélectionnés pour *Lb rhamnosus*

III-4- *Lb farciminis* DSM 20184

• **Sélection des facteurs**

Le tableau 39 représente les résultats de la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 sur les 12 milieux formulés selon le plan de Plackett-Burman, elle a changé clairement avec divers niveaux des variables dans une gamme de 6,84 à 9,95 log 10 UFC ml⁻¹. Cette variation reflète l'importance de l'optimisation pour atteindre une croissance plus élevée.

Tableau 39 : Résultats de la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 selon le plan de Plackett-Burman

expérience	variables indépendantes											Réponse log ₁₀ UFC ml ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *	
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1	9,86
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1	9,27
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1	8,83
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1	8,16
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1	7,85
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1	9,82
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1	6,84
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1	9,73
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1	9,08
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1	8,66
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1	9,95
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1	8,60

*E₁ et E₂ représentent les erreurs.

Les données du tableau 40 et de la figure 22 montrent que le pH est le facteur le plus significatif sur la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184, suivi par le taux d'inoculation. Les variables lactulose, K₂HPO₄, acétate de sodium et l'agitation ont un effet négatif sur la croissance de la souche d'intérêt. Le reste des variables y compris : glucose, tween80, MgSO₄ n'ont pas d'effet significatif sur la croissance du même lactobacille. Alors, seulement deux

facteurs physiques pH et taux d'inoculation ont été retenus pour la prochaine étape de l'optimisation.

Tableau 40 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184

variable	Effet	Coef	SE Coef	t	p
glucose	0,0098	0,0049	0,00898	0,55	0,639
lactulose	-0,0255	-0,0128	0,00898	-1,42	0,291
tween 80	-0,0567	-0,0283	0,17951	-0,16	0,889
K ₂ HPO ₄	-0,7983	-0,3992	0,08976	-4,45	0,047
acetate de sodium	-0,1087	-0,0543	0,03590	-1,51	0,269
MgSO ₄	-1,4500	-0,7250	0,89757	-0,81	0,504
pH	3,2481	1,6241	0,19946	8,14	0,015
agitation	-0,0044	-0,0022	0,00150	-1,46	0,282
taux d'inoculation	0,2833	0,1417	0,05984	2,37	0,142

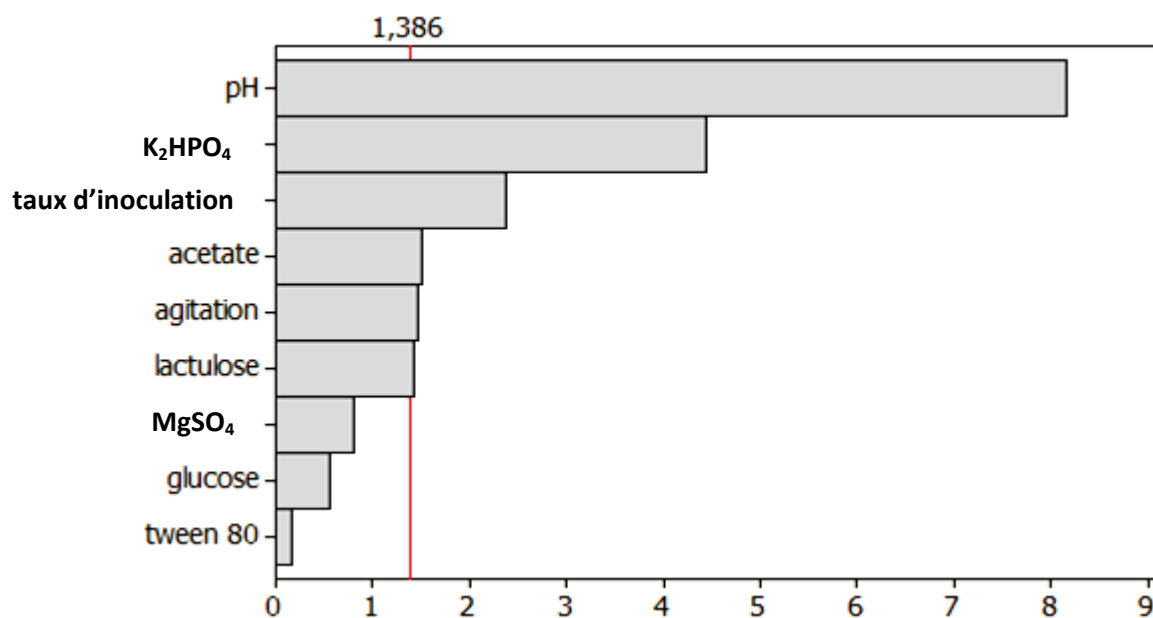


Figure 22 : Diagramme de Pareto pour la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184

• **Détermination des optima**

Une matrice de 13 expériences a été obtenue. Le tableau 41 montre les expériences réalisées selon ce plan ainsi que les réponses correspondantes. La plus forte production de biomasse était 8,81 log₁₀ UFC ml⁻¹, obtenu à partir de la combinaison 11: pH 6,8 et un taux d'inoculation de 3%.

Tableau 41 : Résultats de la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 selon le plan de Box et Wilson

expérience	X_1 pH	X_2 taux d'inoculation	log ₁₀ UFC ml ⁻¹
1	5,75000	0,17157	8,46
2	4,68934	3,00000	8,05
3	5,75000	5,82843	8,53
4	6,50000	1,00000	8,60
5	6,50000	5,00000	8,72
6	5,75000	3,00000	8,46
7	5,75000	3,00000	8,48
8	5,75000	3,00000	8,51
9	5,00000	5,00000	8,29
10	5,75000	3,00000	8,50
11	6,81066	3,00000	8,81
12	5,00000	1,00000	8,48
13	5,75000	3,00000	8,46

La croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y = 8,48200 + 0,20310 X_1 + 0,00362 X_2 - 0,01100 X_1^2 + 0,02150 X_2^2 + 0,07750 X_1 X_2 \quad (3)$$

Où :

Y est la réponse (log 10 UFC ml⁻¹)

X_1, X_2 sont pH et taux d'inoculation respectivement

Le coefficient linéaire X_1 est significatif $P < 0,05$ (Tableau 42).

D'autre part, le modèle choisi est représentatif du système car la valeur du P ainsi que la valeur de l'inadéquation du modèle est très faible 0,004 (Tableau 43). Cela suggère que les données expérimentales obtenues ont été ajustées avec précision par le modèle.

Tableau 42: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lb farciminis* DSM 20184

Terme	Coefficient	T	P
constant	8,48200	230,785	0,000
X ₁	0,20310	6,990	0,000
X ₂	0,00362	0,125	0,904
X ₁ X ₁	-0,01100	-0,353	0,734
X ₂ X ₂	0,02150	0,690	0,512
X ₁ X ₂	0,07750	1,886	0,101

Tableau 43 : Analyse de variance pour *Lb farciminis* DSM 20184

Source	DL	SS séq	Som Car ajust	CM ajust	F	p
Régression	5	0,358692	0,358692	0,071738	10,62	0,004
Linéaire	2	0,330103	0,330103	0,165051	24,44	0,001
Carré	2	0,004564	0,004564	0,002282	0,34	0,724
Intéraction	1	0,024025	0,024025	0,024025	3,56	0,101
Erreur résiduelle	7	0,047277	0,047277	0,006754		
Inadéquation de l'ajustement	3	0,045197	0,045197	0,015066	28,97	0,004
Erreur pure	4	0,002080	0,002080	0,000520		
Total	12	0,405969				

DL : Degrés de liberté, SS séq; somme carée, Som Car ajust : somme carée ajustée, CM ajust : carrée moyenne ajustées, F : rapport des variances, p : probabilité

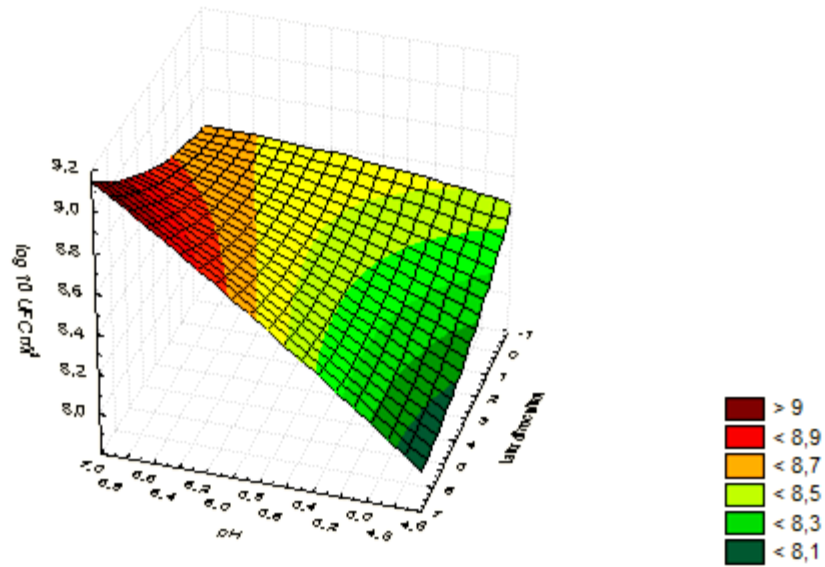


Figure 23: Surface de réponse de la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 en fonction du taux d'inoculation et du pH

La figure 23 représente l'effet du pH et le taux d'inoculation ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance cellulaire. La croissance maximale se situe à l'intervalle de 6,4 à 7 pour le pH et de 4% à 7% pour le taux d'inoculation. Les valeurs optimales du pH et du taux d'inoculation sont 6,8 et 4% respectivement (Figure 24).

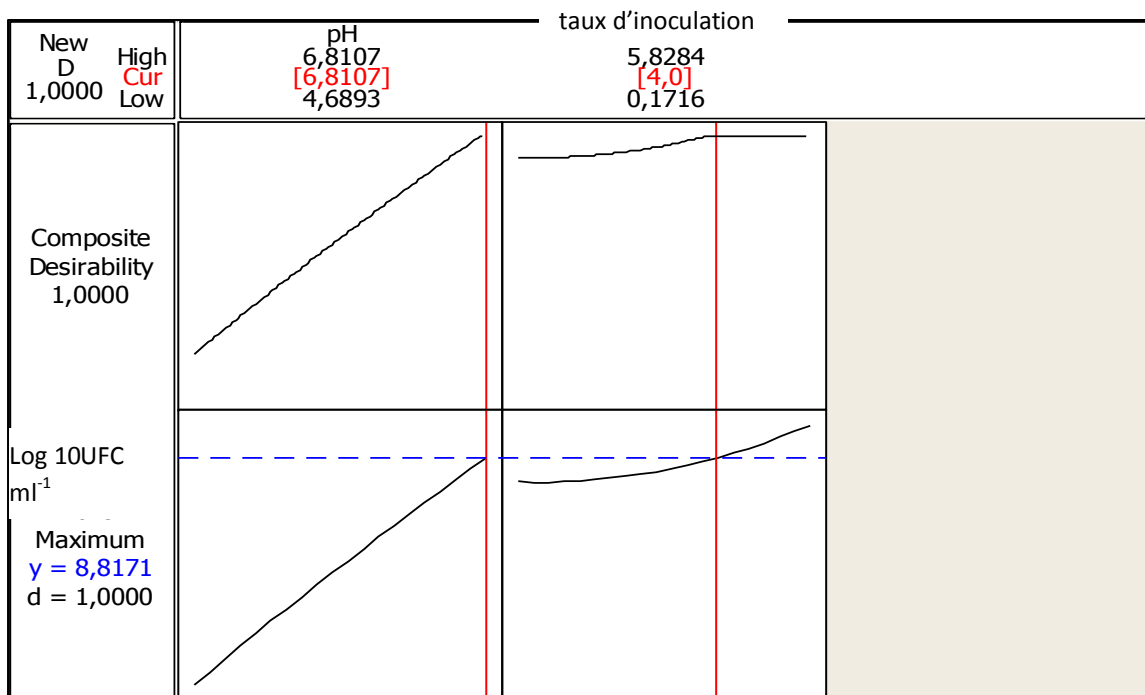


Figure 24 : Les optima des facteurs sélectionnés pour *Lb farciminis* DSM 20184

III-5- *Lb fermentum* DSM 20049

• Sélection des facteurs

La plus faible croissance 8,90 log₁₀ UFC ml⁻¹ a été obtenue à partir de l'expérience 3 tandis que la meilleure croissance 10,45 log₁₀ UFC ml⁻¹ a été obtenue à partir de l'expérience 1 (Tableau 44).

Tableau 44 : Résultats de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 selon le plan de Plackett-Burman

expérience	variables indépendantes											réponse log ₁₀ UFC ml ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	E ₁ *	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	E ₂ *	
1	20	0	1	0	-1	0	0,2	6,4	120	1	1	10,45
2	20	20	0	2	-1	0	0,0	6,4	120	4	-1	9,20
3	0	20	1	0	1	0	0,0	5,5	120	4	1	8,90
4	20	0	1	2	-1	5	0,0	5,5	0	4	1	9,46
5	20	20	0	2	1	0	0,2	5,5	0	1	1	8,97
6	20	20	1	0	1	5	0,0	6,4	0	1	-1	10,05
7	0	20	1	2	-1	5	0,2	5,5	120	1	-1	9,30
8	0	0	1	2	1	0	0,2	6,4	0	4	-1	10,30
9	0	0	0	2	1	5	0,0	6,4	120	1	1	9,98
10	20	0	0	0	1	5	0,2	5,5	120	4	-1	9,08
11	0	20	0	0	-1	5	0,2	6,4	0	4	1	9,38
12	0	0	0	0	-1	0	0,0	5,5	0	1	-1	9,16

*E₁ et E₂ représentent les erreurs.

Les données représentées dans le tableau 45 et la figure 25 ont permis de classer les variables testées au cours de cette partie d'étude en trois catégories :

- Les variables ayant un effet significatif : pH est la plus significative ($P = 0,001$) suivi par le tween80 et le $MgSO_4$.
- Les variables à effet négatif : lactulose, agitation et taux d'inoculation.
- Les variables insignifiantes : glucose, K_2HPO_4 et acétate de sodium.

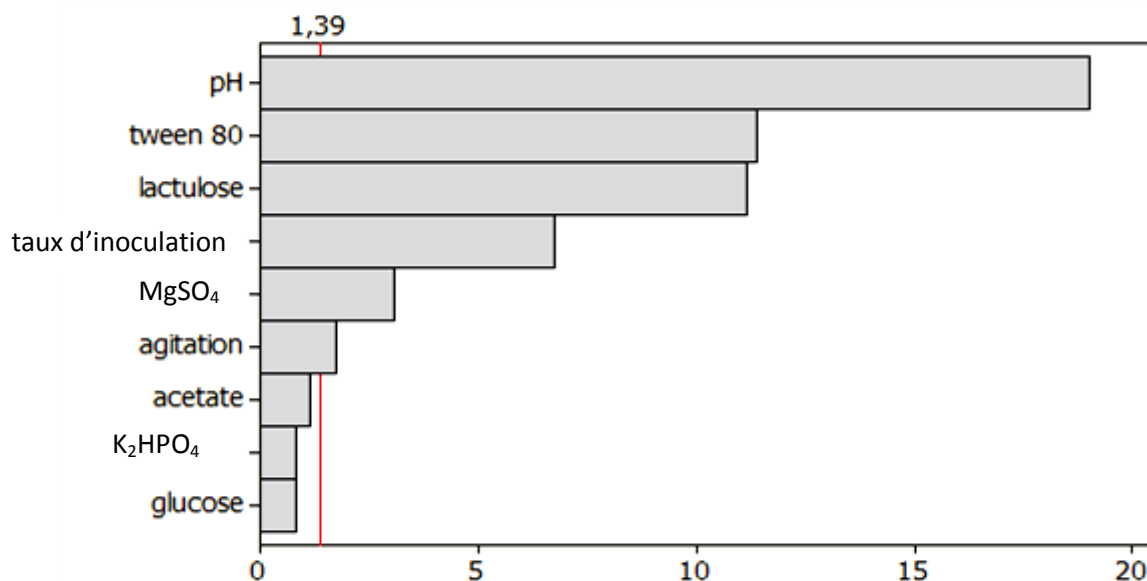


Figure 25 : Diagramme de Pareto pour la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049

Tableau 45 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049

variable	Effet	Coef	SE Coef	t	p
glucose	0,00317	0,00158	0,001967	0,81	0,505
lactulose	-0,04383	-0,02192	0,001967	-11,14	0,008
tween 80	0,89667	0,44833	0,039335	11,40	0,008
K_2HPO_4	0,03167	0,01583	0,019667	0,81	0,505
acetate de sodium	0,01800	0,00900	0,007867	1,14	0,371
$MgSO_4$	1,21667	0,60833	0,196674	3,09	0,091
pH	1,66296	0,83148	0,043705	19,02	0,003
agitation	-0,00114	-0,00057	0,000328	-1,74	0,224
taux d'inoculation	-0,17667	-0,08833	0,013112	-6,74	0,021

• **Détermination des optima**

Basée sur les résultats obtenus à partir du modèle de Plackett-Burman, les facteurs pH, tween80 et MgSO₄ ont été sélectionnés pour une optimisation en utilisant le modèle Box et Wilson. Une matrice de 20 expériences a été obtenue. Le tableau 46 montre les conditions expérimentales ainsi que les résultats de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 obtenue pour chaque expérience. La meilleure croissance 10,48 log 10 UFC ml⁻¹ a été obtenue à partir de l'expérience 10.

Tableau 46 : Résultats de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 selon le plan de Box et Wilson

expérience	X₁ pH	X₂ tween80	X₃ MgSO₄	Log 10 UFC ml⁻¹
1	5,50000	3,000	0,300000	9,18
2	5,50000	3,000	0,100000	9,20
3	5,95000	2,000	0,200000	10,19
4	5,50000	1,000	0,300000	9,20
5	5,95000	2,000	0,200000	10,18
6	6,40000	3,000	0,300000	9,80
7	5,95000	2,000	0,200000	10,22
8	6,40000	3,000	0,100000	9,47
9	5,95000	3,680	0,200000	9,35
10	5,95000	0,318	0,200000	10,48
11	5,50000	1,000	0,100000	9,22
12	5,95000	2,000	0,031821	9,20
13	6,40000	1,000	0,300000	10,40
14	5,95000	2,000	0,200000	10,10
15	5,95000	2,000	0,200000	10,21
16	5,19319	2,000	0,200000	8,93
17	5,95000	2,000	0,368179	9,61
18	6,70681	2,000	0,200000	9,70
19	5,95000	2,000	0,200000	10,20
20	6,40000	1,000	0,100000	9,41

La croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y = 10,0682 + 0,2305X_1 - 0,4216 X_2 + 0,1030 X_3 - 0,3114 X_1^2 - 0,2236 X_2^2 - 0,2796 X_3^2 - 0,0937 X_1X_2 + 0,1700 X_1X_3 - 0,1237 X_2X_3 \quad (9)$$

Où :

Y est la réponse (log 10 UFC ml⁻¹)

X₁, X₂ et X₃ sont pH, tween80 et MgSO₄ et respectivement

Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité correspondantes (P) sont donnés dans le tableau 47. À partir de ces derniers, on peut conclure que les deux coefficients linéaires X₁ (pH) et X₂ (tween80), les coefficients quadratiques X₁² (pH × pH) et X₃² (MgSO₄ × MgSO₄) et le coefficient d'interaction X₁X₃ (pH × MgSO₄) sont significatifs.

L'équation 9 est réduite à l'équation 10 suivante :

$$Y = 10,0682 + 0,2305X_1 - 0,4216 X_2 - 0,3114 X_1^2 - 0,2796 X_3^2 + 0,1700 X_1X_3 \quad (10)$$

La valeur de R² 0,9328 montre que le modèle peut expliquer des variations totales de la réponse à 93,28%. Les valeurs de R² ajusté est 0,87. Cela veut dire que le modèle choisi est représentatif du système. En outre, le tableau 48 montre que la valeur de P et de l'inadéquation de l'ajustement est très faible (0,000 et 0,001 respectivement) ce qui montre une signification très élevée pour le modèle de régression et confirme aussi la forte corrélation existant entre la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 et les facteurs sélectionnés.

Tableau 47 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lb fermentum* DSM 20049

Terme	Coefficient	T	P
constant	10,0682	142,500	0,000
X₁	0,2305	4,045	0,002
X₂	-0,4216	-4,217	0,002
X₃	0,1030	1,807	0,101
X₁X₁	-0,3114	-6,705	0,000
X₂X₂	-0,2236	-2,138	0,058
X₃X₃	-0,2796	-6,020	0,000
X₁X₂	-0,0937	-1,003	0,340
X₁X₃	0,1700	2,727	0,021
X₂X₃	-0,1237	-1,323	0,215

Tableau 48 : Analyse de variance pour *Lb fermentum* DSM 20049

Source	DL	SS séq	Som Car ajust	CM ajust	F	<i>p</i>
Régression	9	4,31665	4,31665	0,47963	15,43	0,000
Linéaire	3	1,67037	1,16301	0,38767	12,47	0,001
Carré	3	2,32937	2,32937	0,77646	24,97	0,000
Intéraction	3	0,31690	0,31690	0,10563	3,40	0,062
Erreur résiduelle	10	0,31093	0,31093	0,03109		
Inadéquation de l'ajustement	5	0,30160	0,30160	0,06032	32,31	0,001
Erreur pure	5	0,00933	0,00933	0,00187		
Total	19	4,62758				

DL : Degrés de liberté, SS séq; somme carée, Som Car ajust : somme carée ajustée, CM ajust : carrée moyenne ajustées, F : rapport des variances, *p* : probabilité

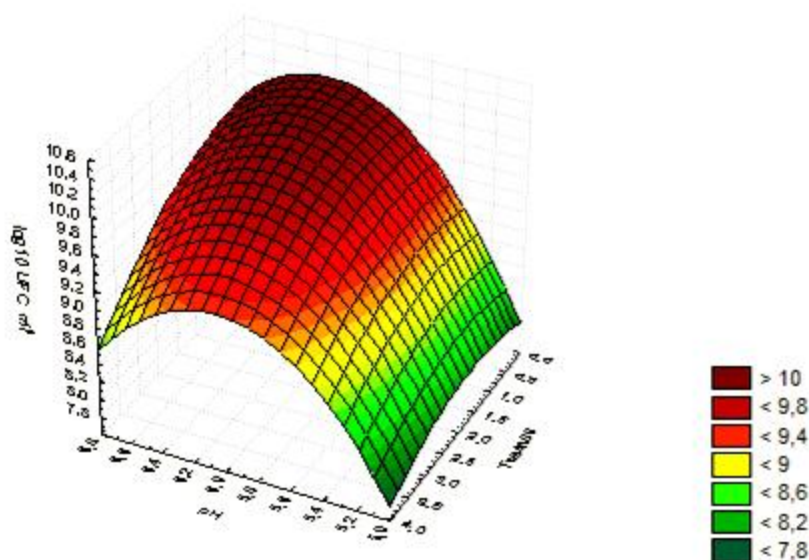


Figure 26a: Surface de réponse de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 en fonction du pH et tween80

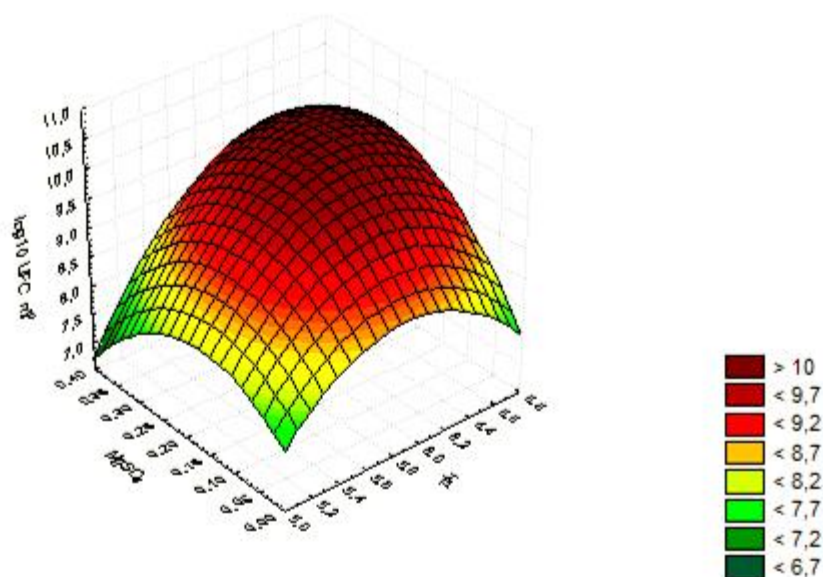


Figure 26b: Surface de réponse de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 en fonction du pH et $MgSO_4$

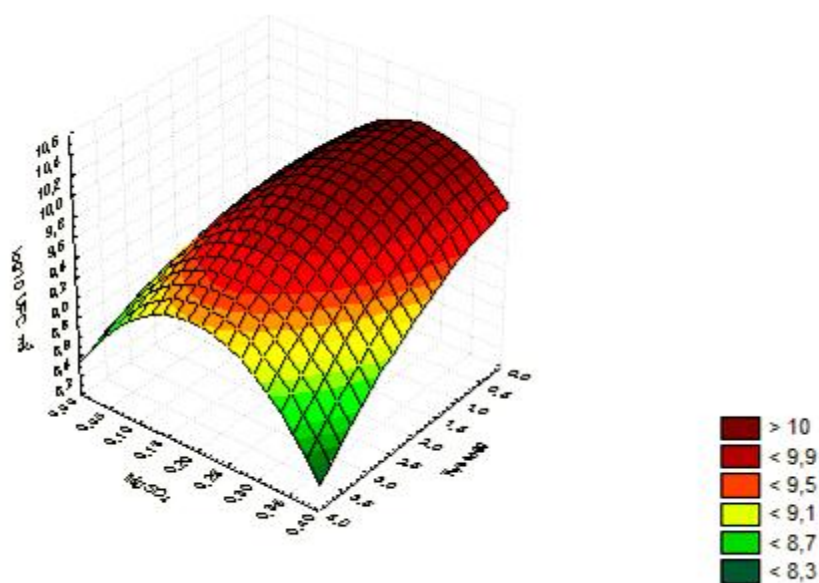


Figure 26c : Surface de réponse de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 en fonction du $MgSO_4$ et tween 80

Les figures 26a, 26b et 26c montrent que des concentrations élevées du tween 80 peuvent influencer négativement la croissance donc sa valeur optimale se situe aux alentours de 0,5 ml l^{-1} . Les valeurs suggérés par le logiciel sont : pH : 6,29, tween80 : 0,55 ml l^{-1} et $MgSO_4$: 0,27 g l^{-1} (Figure 27).

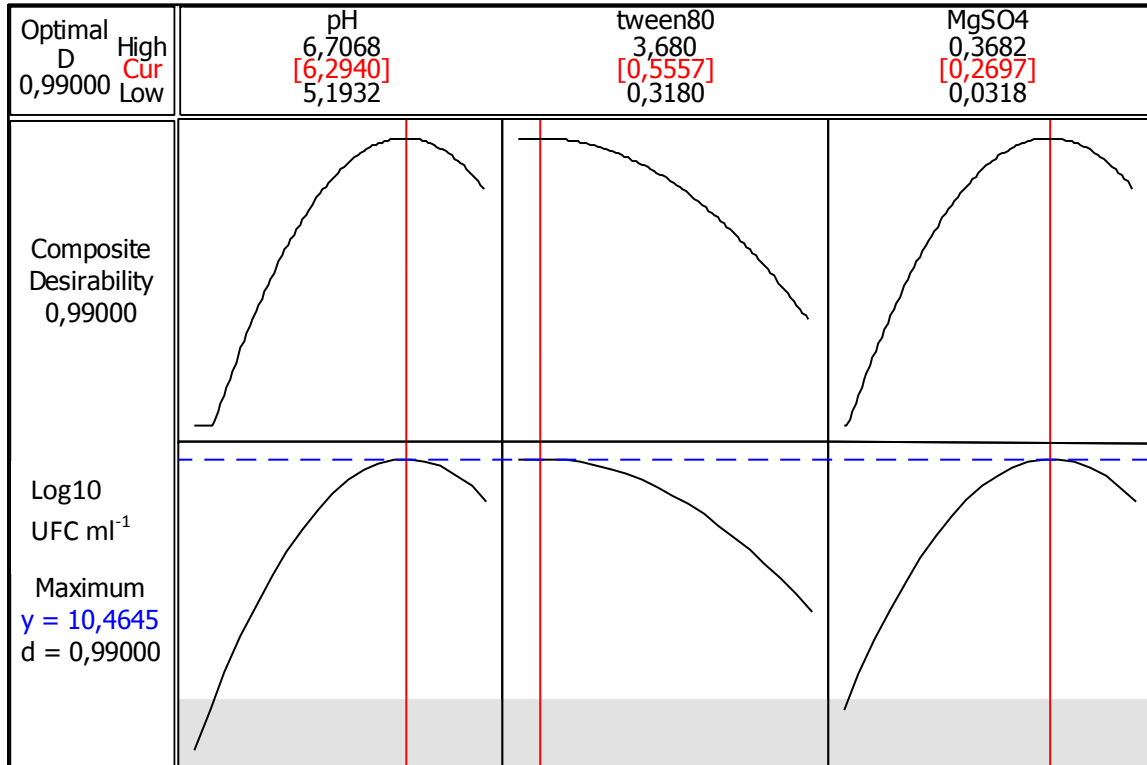


Figure 27 : Les optima des facteurs sélectionnés pour *Lb fermentum* DSM 20049

IV-Validation des modèles

Les valeurs optimales des différents facteurs ont été obtenues en utilisant le logiciel MINITAB 16. La validation du modèle a été réalisée par la réalisation des cultures sur des milieux contenant les facteurs sélectionnés à la valeur optimale déterminée.

Les conditions optimales de la croissance estimées par l'équation du modèle pour chaque lactobacille sont les suivantes :

- *Lb plantarum* BH14: 11,59 g l⁻¹ de glucose, 11,59 g l⁻¹ de lactulose et 0,23 g l⁻¹ de MgSO₄. La croissance simulée sous ces conditions est de 8,95 log₁₀ UFC ml⁻¹ alors que la valeur expérimentale est 9,30 log₁₀ UFC ml⁻¹.
- *Lb brevis* CHTD27 : 8,03 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 1,69 g l⁻¹ de K₂HPO₄. La croissance estimée dans ces conditions est de 11,0 log₁₀ UFC ml⁻¹. la valeur expérimentale est de 10,7 log₁₀ UFC ml⁻¹.
- *Lb rhamnosus* : 0,7 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 0,11 g l⁻¹ MgSO₄ et un taux d'inoculum de 1,3%. La croissance estimée est de 10,0 log₁₀ UFC ml⁻¹ alors que la valeur expérimentale est de 9,9 log₁₀ UFC ml⁻¹.
- *Lb farciminis* DSM 20184 : un pH de 6,81 et un taux d'inoculation de 4%. La croissance simulée sous ces conditions est de 8,81 log₁₀ UFC ml⁻¹. La valeur expérimentale est de 8,68 log₁₀ UFC ml⁻¹.
- *Lb fermentum* DSM 20049: 0,55 ml l⁻¹ de tween80, 0,27 g l⁻¹ de MgSO₄ et un pH de 6,3. La croissance estimée dans ces conditions est de 10,46 log₁₀ UFC ml⁻¹, tandis que la valeur expérimentale est de 10,13 log₁₀ UFC ml⁻¹.

Les valeurs expérimentales sont proches des valeurs théoriques.

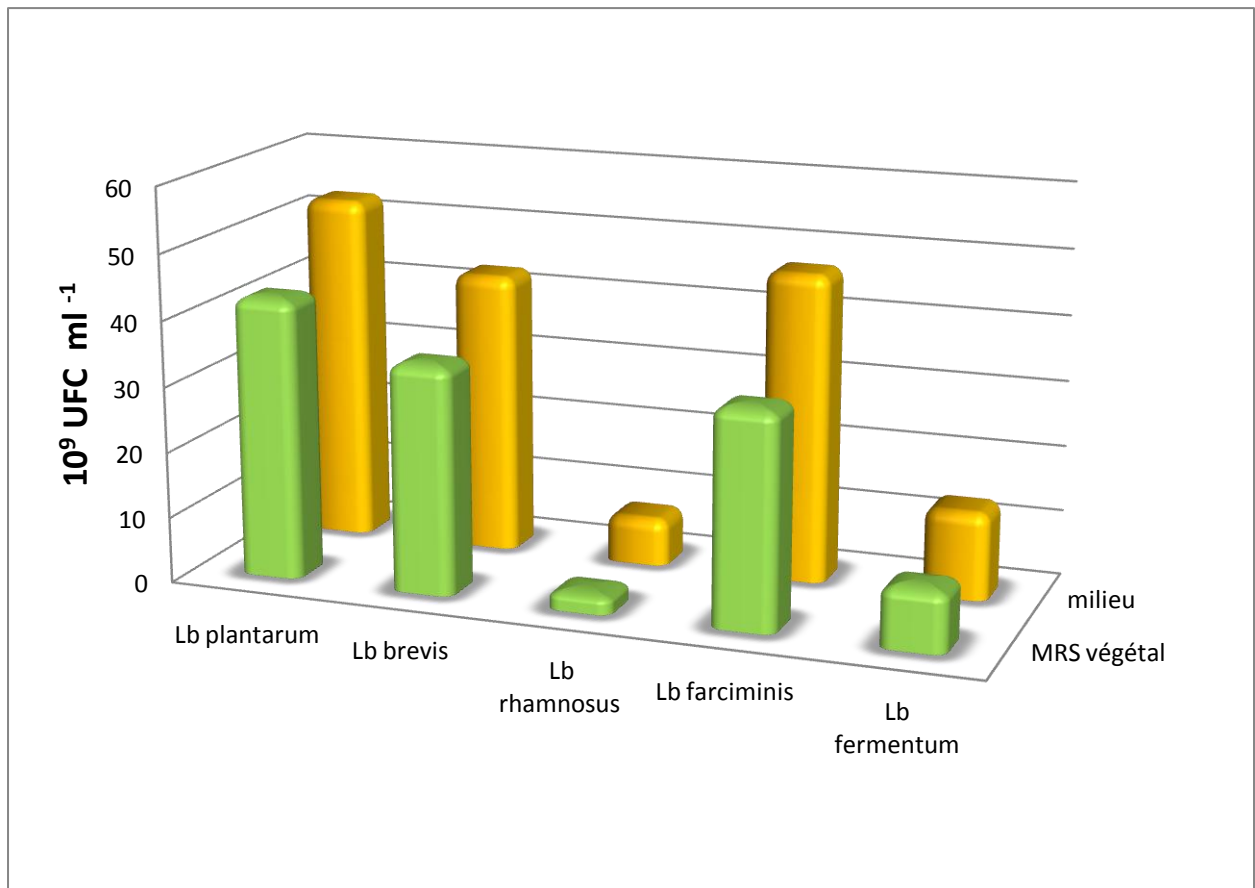


Figure 28 : Croissance des lactobacilles sur leurs milieux optimisés et le milieu MRS végétal

V-Croissance sur les milieux optimisés et le milieu MRS végétal

L'examen de la figure 28 montre que la croissance des 5 souches de lactobacilles sur les milieux optimisée est meilleure que leur croissance sur le milieu MRS végétal témoin :

Lb plantarum BH14 : $53 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu élaboré et $43 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu témoin.

Lb brevis CHTD27: $43 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu élaboré et $33 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu témoin.

Lb rhamnosus : $7,3 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu élaboré et $3,0 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu témoin.

Lb farciminis DSM 20184 : $47 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu élaboré et $33 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu témoin.

Lb fermentum DSM 20049: $13,4 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu élaboré et $9,5 \cdot 10^9$ UFC ml⁻¹ sur le milieu témoin.

VI- Cinétique de croissance

Les figures 29,30, 31, 32 et 33 montrent les cinétiques de croissance de chaque *Lactobacillus* sur le milieu optimisé. La croissance a été estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm. On peut faire les remarques suivantes :

- ❖ La croissance bactérienne, pour les cinq souches de lactobacilles dans les milieux optimisés se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue.
- ❖ La phase exponentielle de la croissance débute après 2h pour *Lb fermentum* DSM 20049. Tandis qu'elle débute après environ 4h pour les quatre souches restantes.
- ❖ *Lb plantarum* BH14 et *Lb brevis* CHTD27 continuent à croître pour atteindre une croissance maximale (DO : $4,4\pm 1$ et 5 ± 1 respectivement) après 24 h d'incubation.
- ❖ *Lb rhamnosus* atteint une DO maximale $4,6\pm 1$ après 22 h d'incubation.
- ❖ Une croissance maximale (DO : $3,4\pm 1$) de *Lb farciminis* DSM 20184 est constatée après 23h d'incubation.
- ❖ *Lb fermentum* DSM 20049 atteint sa croissance maximale après seulement 16 h d'incubation.

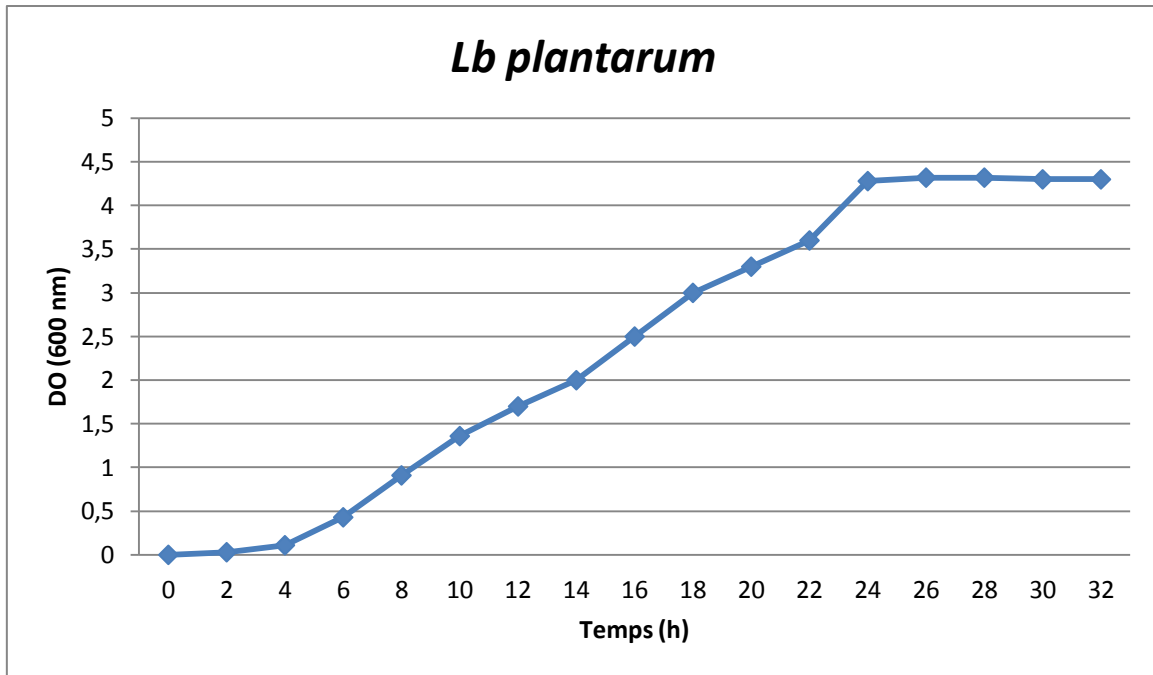


Figure 29 : Cinétique de la croissance de *Lb plantarum* BH14 sur le milieu optimisé

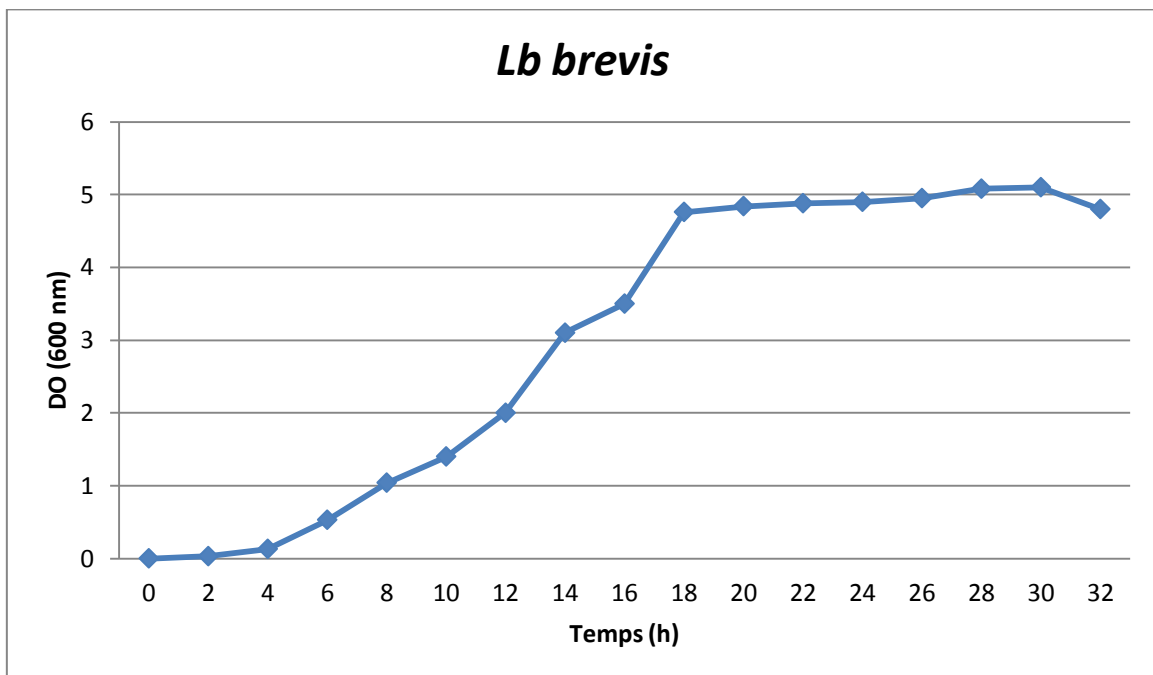


Figure 30 : Cinétique de la croissance de *Lb brevis* CHTD27 sur le milieu optimisé

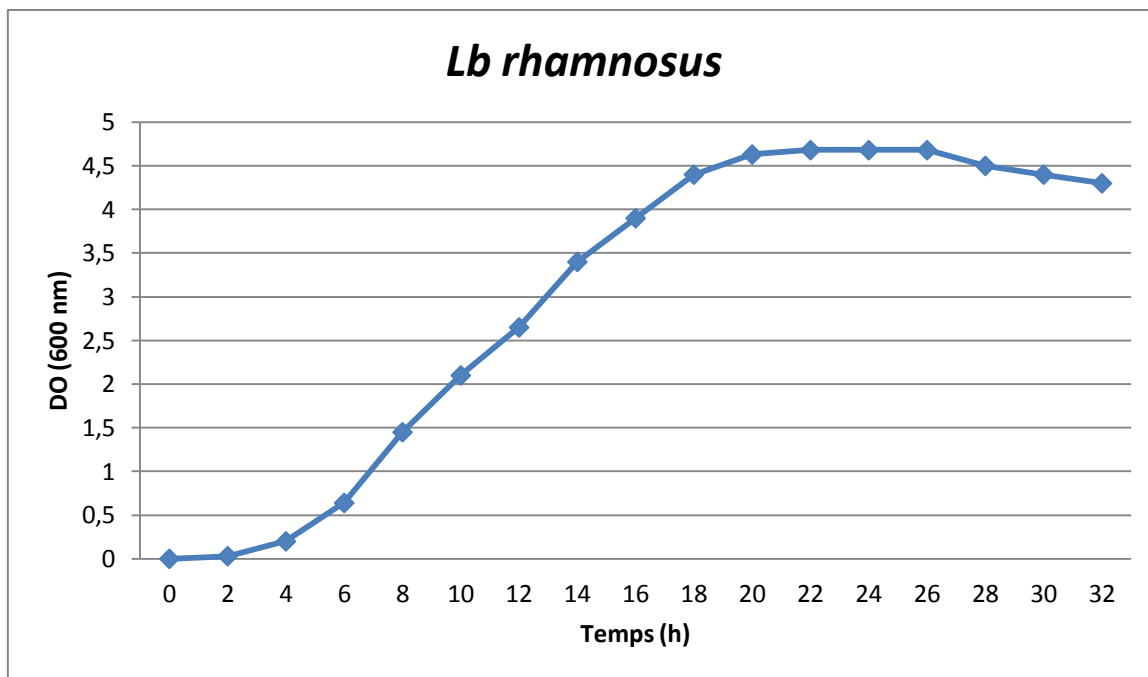


Figure 31: Cinétique de la croissance de *Lb rhamnosus* sur le milieu optimisé

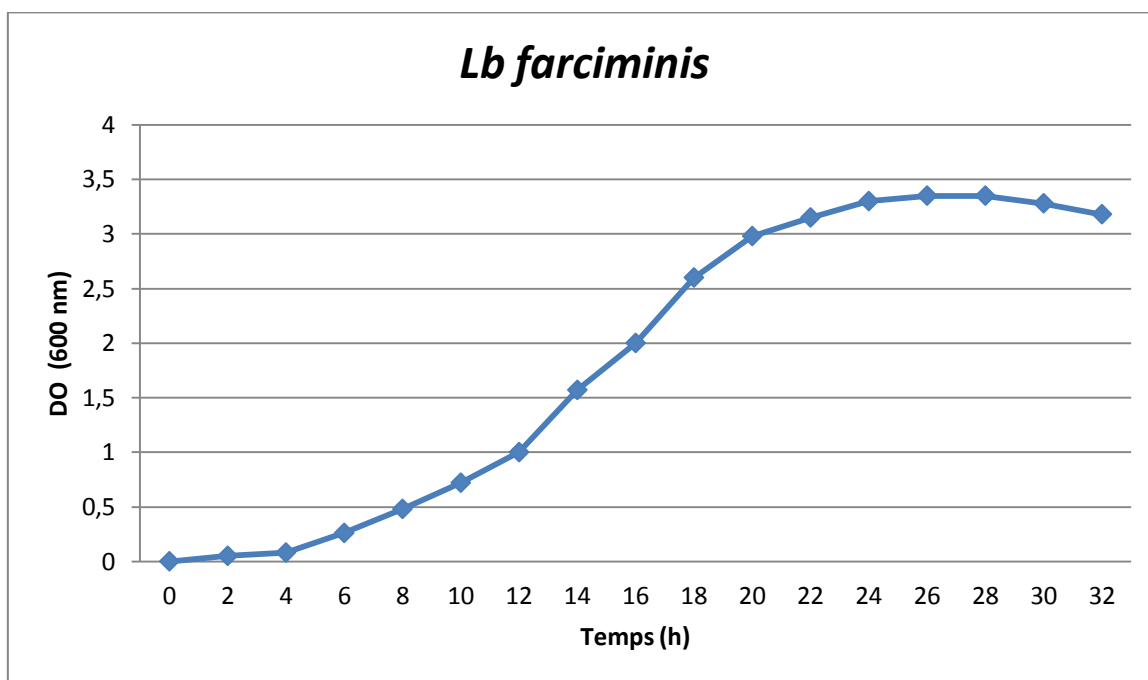


Figure 32: Cinétique de la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 sur le milieu optimisé

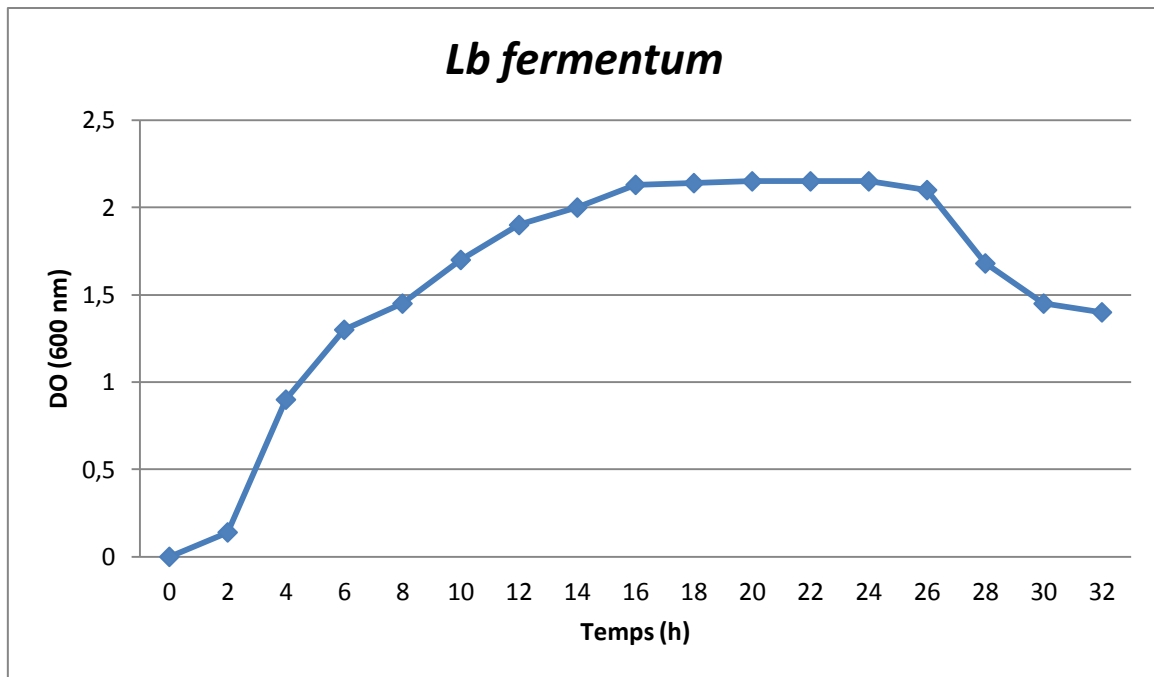


Figure 33 : Cinétique de la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049 sur le milieu optimisé



Discussion

Les BL se caractérisent par leurs fortes exigences auxotrophiques en raison de leur capacité limitée de la biosynthèse des vitamines et des acides aminés. Leur croissance est possible seulement sur des milieux de culture riches et complexes contenant essentiellement : source d'azote (peptides, acides aminés), source de carbone, des vitamines et des minéraux. Ces nutriments doivent être fournis en concentrations optimales (Djeghri et *al.*, 2010). En outre, la croissance des BL dépend des conditions de culture y compris, la température, le pH et l'oxygène (Saelee et Sriroth, 2014). Par conséquent, la détermination d'un milieu de culture approprié semble être difficile. Plusieurs études ont été faites sur l'optimisation des milieux de culture pour la croissance des BL (Gaudreau et *al.*, 2002 ; Gao et *al.*, 2009 ; Aguirre-Ezkauriatza et *al.*, 2010 ; Hwang et *al.*, 2012).

En effet, le type de milieu de culture joue un rôle important dans l'activité de la croissance et la production de biomasse. Divers milieux, comme de Man Rogosa, Sharp (MRS), le bouillon M17, le bouillon Elikor, le lait écrémé et le perméat de lactosérum ont été largement utilisés. Afin de choisir le milieu de culture approprié, différents aspects doivent être pris en considération: le coût, la capacité d'atteindre un nombre élevé de cellules, et la facilité de la récupération de la biomasse ou des métabolites (Georgieva et *al.*, 2009). Les milieux commerciaux (ATP, MRS, TGE) habituels pour la production des BL et de leurs métabolites, sont caractérisés par une composition qui est particulièrement riche en sels et en source d'azote (tryptone, bactopectone, extrait de levure, extrait de viande, souvent plusieurs d'entre eux en même temps). D'un point de vue industriel, l'utilisation de ces milieux, qui sont très coûteux, réduit la rentabilité de la culture à grande échelle des BL, que ce soit pour la production de la biomasse probiotique, des bactériocines, de l'acide lactique et acétique ou pour la production des cultures starters (Vazquez et *al.*, 2008).

Parmi les diverses sources d'azote, l'extrait de levure donne une forte croissance et production de l'acide lactique en raison de sa richesse en facteurs de croissance, y compris des acides aminés, des vitamines, des minéraux spécifiques, des acides gras, des purines et des pyrimidines. Tandis que son coût constitue 38% du coût total de la production qui est relativement élevé au point de vue économique à l'échelle industrielle. Par conséquent, d'autres sources d'azote organiques et des sous-produits agricoles ont été utilisés pour remplacer partiellement ou totalement l'extrait de levure tel que les peptones, l'hydrolysate du soja, liqueur de maïs, le son de riz et le son de blé (Saelee et Sriroth, 2014).

Dans chaque processus de fermentation, l'optimisation des paramètres physiques et chimiques est d'une grande importance due à son impact économique. En effet, l'optimisation d'un milieu de culture implique la détermination des nutriments ainsi que leurs concentrations pour un maximum de biomasse. L'utilisation de l'approche statistiques pour optimiser la composition du milieu de culture ainsi que les conditions de culture a augmenté en biotechnologie, en raison de son applicabilité et pertinence (Reddy et al., 2008). Zhang et al., (2009) ont utilisé la méthode statistique pour le développement d'un milieu de culture chimiquement défini pour un maximum de croissance de *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*, 19 facteurs nutritionnels parmi 57 facteurs testés ont été sélectionnés. Naveena et al., (2005) ont testé 15 variables pour l'optimisation de la production de l'acide lactique par *Lactobacillus amylophilus* GV6 en utilisant le plan de Plackett et Burman. Hwang et al., (2012) ont également utilisé l'approche statistique pour déterminer l'effet de 15 variables sur la croissance de *Lb plantarum* Pi06. Gao et al., (2009) ont testé 11 facteurs pour optimiser la composition du milieu de culture pour *Lb fermentum* en utilisant la méthode des surfaces de réponse.

La souche *Lb plantarum* a été utilisée pour sélectionner le milieu de base parce qu'elle a l'aptitude de fermenter plusieurs types de substrats complexes allant de substrat végétal à des milieux liquides comme le milieu MRS et les milieux chimiquement définis (Wegkamp et al., 2009). Le choix de cette souche est dictée par les résultats des travaux de recherche menés par Djeghri et al, (2007 a) et Kassas et al., (2009). Elle est moins exigeante et se caractérise par sa tolérance à l'acidité (Djeghri et al, 2007 a). Elle est largement utilisée dans la fermentation des dérivés végétaux. Parmi les espèces de *Lactobacillus*, *Lb plantarum* est la plus utilisée traditionnellement dans les aliments fermentés tels que les viandes, les légumes et les produits laitiers (Hwang et al., 2012). Elle a un métabolisme homofermentaire et comme la plupart des BL, elle possède un statut GRAS. La capacité de *Lb plantarum* pour maintenir son gradient de pH dans de telles conditions peut être un facteur contribuant à son utilisation à mettre fin à la plupart des fermentations végétales (McDonald et al., 1990). Plusieurs études ont été basées sur l'élaboration des milieux de culture pour la croissance de *Lb plantarum*; Horn et al, (2005) ont élaboré un milieu de culture pour *Lb plantarum* à base des hydrolysats des intestins des poissons. Teusink et al., (2006) ont défini un milieu complexe pour *Lb plantarum* WCFS. Saguir et de Nadra (2007) ont également élaboré un milieu de culture chimiquement défini pour la croissance de *Lb plantarum*. Un milieu minimal a été proposé par Wegkamp et al., (2010) pour la croissance de ce lactobacille.

Krzywonos et Eberhard (2011) ont formulé un milieu de culture à base du blé et des sucres de betteraves. Hwang et *al.*, (2012) ont utilisé l'approche statistique pour l'optimisation de la composition du milieu de culture pour *Lb plantarum* Pi06.

La première partie de notre étude a pour but de sélectionner la constitution du milieu de base. La détermination de la composition des jus végétaux montre que ces derniers sont riches en matières nutritives et qu'ils présentent des qualités adéquates pour élaborer des milieux de culture pour la croissance des bactéries lactiques.

A cet égard, les jus végétaux ont été testés pour la croissance de *Lb plantarum* BH14. Les résultats montrent que dans la première série des milieux, la meilleure croissance de *Lb plantarum* a été obtenue sur JPC vu la richesse de ce milieu en sources d'azote et en sels minéraux. L'hydrolyse enzymatique contribue à la richesse de la composition de ce jus végétal en matière azotée par la dégradation des protéines du pois et la libération des acides aminés et de courts peptides. En plus l'examen des résultats de la composition de ce jus montre sa richesse en éléments minéraux surtout en potassium et magnésium nécessaires pour plusieurs activités bactériennes.

Dans la deuxième série, la combinaison de 50% de JPC et 50% de JFS a donné la meilleure croissance de ce lactobacille ; elle était proche à celle obtenue sur le milieu MRS végétal témoin. Cela peut être expliqué par la teneur élevée en sucre contenant dans JFS et sa richesse en manganèse complémente la composition du JPC. Ce qui assure la source d'azote et de carbone indispensables à la bonne croissance du lactobacille. Ces résultats ont été obtenus sur des milieux dépourvus de peptone et d'extrait de levure ou de viande ce qui montre la faisabilité de l'utilisation des substrats végétaux dans la formulation des milieux de culture des BL pour remplacer totalement les composants azotés coûteux. Nos résultats concordent avec plusieurs études. Djeghri et *al.*, (2007a) ont formulé des milieux de culture à base du pois et pois chiche afin de remplacer partiellement les extrait de viande ou de levure et les peptones. Nos résultats sont en accord avec ceux de Djeghri et *al.*, (2007a) qui ont rapporté que le milieu de culture à base de pois a donné une meilleure croissance de *Lb plantarum*.

Derradji et *al.*, (2016) ont sélectionné un milieu de culture à base de jus de datte additionné de jus de lentilles ou de jus d' haricots pour la croissance de cette même souche.

Une croissance excellente de *Lb plantarum* BH14 sur des milieux à base des peptones de pomme de terre a été trouvée (Kassas et *al.*, 2009). Gaudreau et *al.*, (2002) ont utilisé l'extrait de pomme de terre pour substituer partiellement l'extrait de levure. La croissance de *Lb plantarum* EQ12 sur ce milieu a été maximale. La sève d'érable constitue une bonne source de

carbone et assure une bonne croissance de *Lb rhamnosus* AC-3, *Lb helveticus* R0052, *Lb casei* AC-8 et *Lb acidophilus* AC-10 (Cochu et al., 2008). Altaf et al., (2006) ont réussi à élaborer un milieu de culture économique pour la production de l'acide lactique par la substitution complète des peptones et d'extrait de levure par la farine des lentilles rouges et des cellules de levure de boulanger en utilisant du son de blé comme substrat.

L'utilisation de l'approche statistique pour optimiser la composition et les conditions de culture a révélé la différence des exigences des lactobacilles. Dans notre étude, le plan Plackett-Burman a été utilisé pour sélectionner les facteurs ayant un effet significatif sur la croissance et le plan de Box et Wilson a été utilisé pour déterminer leurs concentrations optimales.

- **Glucose**

Les souches du genre *Lactobacillus* sont chimiotrophes, elles acquièrent l'énergie nécessaire à leur croissance à partir de l'oxydation des sucres et d'autres composés chimiques. Le glucose était le facteur le plus influençant la croissance de *Lb plantarum* BH14. Sa concentration optimale est 11,59g l⁻¹. Le glucose constitue la meilleure source de carbone pour la production de biomasse de *Lb plantarum* YJG (Han et al., 2011). Il a été rapporté qu'un bon taux de croissance de *Lb plantarum* a été obtenu sur un milieu MRS supplémenté du glucose comme source de carbone (Georgieva et al., 2009).

Ahmed-Gaid et al., (2015) ont rapporté que l'utilisation d'un milieu de culture à base d'autolysat des intestins de poulet additionné de 19.15 g/L de glucose et 0.25 g/L de citrate d'ammonium a donné une bonne croissance de *Lb brevis* avec une densité optique à 600nm de 6 meilleure à celle obtenue sur le milieu MRS témoin. En outre, L'addition de 2% de glucose au milieu de culture avait un effet positif sur la croissance des BL et leur production d'acide lactique : 4.4×10^7 UFC/ml et 2.9 g/l respectivement (Krzywonos et Eberhard, 2011).

Cependant, une faible concentration en glucose a augmenté la croissance de *Lb plantarum* BH14, vu la richesse en sucre du jus végétal à base de figue sèche (46% de glucose selon Slatnar et al., 2011) et une concentration élevée en glucose peut provoquer une inhibition de la croissance cellulaire.

- **Lactulose**

Le lactulose est un dérivé de lactose composé de galactose et fructose, non absorbable par l'intestin grêle. Il est utilisé comme sucre prébiotique pour les bactéries lactique et les bifidobactéries (Kontula et *al.*, 2002). L'effet de lactulose sur la croissance des BL a été largement étudié.

Lb plantarum BH14 est capable d'utiliser le lactulose comme source de carbone. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Cardelle-Cobas et *al.*, (2011), qui ont trouvé que la croissance de *Lb plantarum* CLB7 a atteint une valeur maximale en utilisant le lactulose en tant que substrat. Saarela et *al.*, (2003) ont également rapporté que le lactulose était le dérivé du lactose le plus utilisé par les lactobacilles cultivées en anaérobiose à des concentrations de lactulose de 1% ou 2%. Selon Kontula et *al.*, (1999), le lactulose a été mieux utilisé que les autres dérivés du lactose. Une meilleur croissance de *Lb rhamnosus* E-97800 a été obtenu ($1.3 \cdot 10^7$ UFC/ml) en présence du lactulose.

Sareela et *al.*, (2003) ont suggéré que le lactulose peut améliorer la tolérance à la bile et la stabilité au stockage au froid de *Lb salivarius*. Kneifel et *al.*, (2000) ont trouvé que le lactulose a amélioré la croissance de plusieurs souches et parmi les sucres et les dérivés des sucres testés, il était le plus utilisé par ces mêmes souches. Pour les souches de *Lb acidophilus*, la croissance a été maximale en présence du lactulose. D'autres souches tel que *Lb rhamnosus*, *casei*, *paracasei* et *reuteri* ont également largement utilisé ce dérivé. Une synergie a été constaté entre *Lb rhamnosus* VTT E-97800 et le lactulose ce qui a augmenté la production des acides lactiques, butyriques et propioniques (Kontula et *al.*, 2002).

- **Tween80**

Le tween 80 avait un effet significatif sur la croissance de *Lb fermentum* DSM 20049. Plusieurs études ont prouvé l'effet significatif du tween 80 sur la croissance des BL. Le tween 80 (polyoxyethylene sorbitn mono-oleate) est une source d'acide oléique. Cet élément s'est avéré fonctionner comme un tampon pour empêcher l'acidification du milieu de culture (Sawatari et *al.*, 2006). Une croissance maximale de *Lb fermentum* DSM 20049 a été obtenue sur un milieu de culture à base de lactosérum et lupin additionné de 1.56 ml/l de tween 80 (Hanoune et *al.*, 2015). Givry et Duchiron (2008) ont trouvé que le tween 80 a amélioré la croissance de *Lb bifermentans*. Il avait un effet significatif sur la croissance de *Lb sakei* G20 (Lechiancole et *al.*, 2002). Yu et *al.*, (2008) rapportent également que l'addition de 1.5 ml l⁻¹

de tween 80 au milieu de culture à base de mélasse et liqueur de maïs augmente significativement la production de l'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC.

Cela est probablement dû au fait que le tween 80 puisse dissoudre les structures lipidiques dans la membrane cellulaire, ce qui améliore la perméabilité membranaire ainsi que la libération des enzymes intracellulaires. On outre, il favorise la migration des composés nutritifs dans la cellule. C'est un facteur de croissance utilisé dans les milieux de culture afin de favoriser la croissance des lactobacilles (Ben-Kun et *al.*, 2009, Coelho et *al.*, 2011).

Cependant, une concentration plus élevée de tween 80 [1,4% (p / v)] a diminué la production d'acide lactique (Coelho et *al.*, 2011). Cela est probablement dû au fait que l'agent tensio-actif (tween 80) devient toxique à des concentrations plus élevées, conduisant à la destruction de la membrane et / ou la perte de la fonction de la membrane cellulaire provoquée par la solubilité des bicouches lipidiques.

- **Acétate de sodium**

L'acétate de sodium avait un effet significatif sur la croissance de *Lb brevis* CHTD27 et *Lb rhamnosus* sur le milieu de culture JPF. Il constitue une substance inhibitrice du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures. En effet, plusieurs études ont montré l'effet positif de ce facteur sur la croissance des BL. Takao et *al.*, (2002) ont montré l'influence de l'acétate de sodium sur le rendement énergétique des BL. Il stimule et stabilise l'activité de L-lactate déshydrogénase LDHs chez *Lb sakei* NRIC 1071^T et *Lb plantarum* NRIC 1067^T.

En outre, Il joue un rôle de tampon dans le milieu de culture car le maintien du pH au cours de la fermentation est un paramètre non négligeable pour atteindre une croissance maximale. C'est un agent tampon couramment utilisé dans les milieux de culture des BL (Saeed et *al.*, 2013). Selon Sawatari et *al.*, (2006), l'utilisation de l'acétate de sodium comme tampon dans le milieu de culture a donné une croissance de *Lb plantarum* NRIC 0380 similaire à celle obtenue sur milieu témoin MRS. McDonald et *al* (1990) rapportent que *Lb plantarum* a maintenu son pH en présence de 160 mM d'acétate de sodium.

Calderon et *al.*, (2001) préconisent que l'ajout de l'extrait de levure et de l'acétate à une solution minérale dans des conditions d'anaérobiose est suffisant pour définir un milieu de fermentation afin de remplacer le milieu MRS.

- **K₂HPO₄**

Les résultats montrent l'influence du phosphate dipotassique K₂HPO₄ sur la croissance de *Lb brevis* CHTD27. En effet, Coelho et al., (2011) rapportent que le rajout du K₂HPO₄ au milieu de culture à base de mélasse a augmenté la production de l'acide lactique par *Lb plantarum* LMISM6 du fait que l'utilisation de K₂HPO₄ dans le milieu de culture fournit le phosphate nécessaire à la phosphorylation durant la glycolyse et le potassium nécessaires à la croissance des microorganismes : il stimule le transport des nutriments et les activités enzymatiques.

En effet, les éléments minéraux interviennent dans de nombreuses fonctions: 1) cofacteurs des enzymes, 2) transport membranaire, et 3) la composition des structures complexes (Saeed et al., 2013).

Ainsi, K₂HPO₄ agit comme agent tampon dans le milieu. Les BL produisent de l'acide lactique pendant la croissance, ce qui diminue la valeur du pH du milieu et ralentit ou même inhibe la croissance. Par conséquent, l'utilisation des agents tampons dans les milieux de culture est indispensable pour maintenir le pH approprié. Le phosphate dipotassique est un agent tampon essentiel qui est couramment utilisé dans les milieux des BL tels que MRS et M17 (Saeed et al., 2013).

- **MgSO₄**

Ce facteur a un effet significatif sur la croissance de *Lb plantarum* BH14, *Lb rhamnosus* et *Lb fermentum* DSM 20049. Mg²⁺ améliore la croissance et la survie des BL (Saeed et al., 2013). Ces ions sont des principaux cofacteurs des enzymes du métabolisme des sucres des BL tel que fructokinase, phosphoketolase, et acétate kinase. Ces ions métalliques jouent un rôle central dans la production de NADPH et de l'ATP et par conséquent, sont essentiels pour de nombreuses fonctions cellulaires, et plus important encore, pour le transport et la réduction de la teneur en fructose (Weymarn et al., 2002). Lechiancole et al., (2002) ont utilisé la surface de réponse pour optimiser la composition du milieu de culture et les conditions de fermentation pour la croissance de *Lb sakei* G20; une espèce utilisée dans la fabrication de saucisses fermentées et ils ont trouvé que l'utilisation de 0,40 g/l de Mg²⁺ a stimulé la croissance de ce lactobacille. L'utilisation d'une combinaison de Mg²⁺ et Mn²⁺ a amélioré la croissance de *Lb plantarum* (Wegkamp et al., 2009). D'après Weymarn et al., (2002), le sulfate du MgSO₄.7H₂O est un cofacteur des enzymes du métabolisme des sucres.

- **pH**

L'effet du pH a été significatif sur la croissance de *Lb farciminis* DSM 20184 et *Lb fermentum* DSM 20049. L'étude de l'influence de pH sur la croissance des BL a fait l'objet de plusieurs études (Bibal et al., 1988 ; Béal et al., 1991 ; Adamberg et al., 2003). La relation entre le pH et la croissance peut être positive ou négative en fonction du pH optimal du microorganisme.

Les BL tolèrent une large gamme de pH (Axelsson, 2004). Généralement, les streptocoques, les lactocoques, et d'autres BL peuvent croître dans une gamme de pH de 4,5 à 7,0.

Au cours de la fermentation, le pH du milieu diminue en raison de l'accumulation des acides organiques, principalement de l'acide lactique. Cependant, le pH du cytoplasme des BL reste plus élevé (pH = 6.6) que le pH extracellulaire, en grande partie parce que les cellules excrètent rapidement l'acide lactique sous forme protonée dans le milieu extracellulaire (Hutkins et Nannen, 1993), en plus la membrane cellulaire est imperméable pour les protons extracellulaires (molécule de lactate).

La capacité à réguler le pH cytoplasmique ou intracellulaire est l'une des caractéristiques physiologiques les plus importantes des BL qui les rend tolérantes à l'acidité, par rapport à de nombreuses espèces bactériennes. Les acides organiques inhibent les micro-organismes en entrant dans la cellule sous la forme non dissociée, puis ils se dissocient dans la cellule. Cela provoque l'acidification du cytoplasme et l'effondrement de la force motrice des protons, ce qui entraîne l'inhibition du transport des éléments nutritifs. Le principal mécanisme de maintien du pH dans les micro-organismes dépend de l'expulsion de protons du cytoplasme par H⁺-ATPases, au détriment de l'ATP. Par conséquent, les acides organiques dans le milieu peuvent contribuer à l'inhibition de la croissance en raison de l'augmentation de la consommation d'énergie pour maintenir l'homéostasie du pH (McDonald, 1990 ; Hutkins et Nannen, 1993)

- **Agitation**

Ce facteur n'avait pas un effet positif sur la croissance des cinq souches de lactobacille. Cela montre que ces bactéries sont anaérobies. L'agitation peut incorporer de l'oxygène qui inhibe la croissance en endommageant certaines enzymes, les lipides membranaires et l'ADN (Piard et Desmazeaud, 1991). Wegkamp et al., (2009) ont rapporté que dans des conditions d'aérobiose, *Lb plantarum* est incapable de croître sur le MMP (milieu minimal *plantarum*),

tandis que dans des conditions d'anaérobiose stricte un rendement en biomasse de 35 mg/l a été trouvé.

- **Taux d'inoculation**

Ce facteur avait un effet significatif sur la croissance de *Lb rhamnosus* et *Lb farciminis* DSM 20184. Dans le procédé de fermentation industrielle le taux d'inoculation utilisé est compris entre 3 et 10% (v / v). L'utilisation du taux d'inoculation approprié diminue la phase de latence (un taux d'inoculation supérieur à 5%). Une meilleure concentration cellulaire de *Lb bulgaricus* a été obtenue avec un taux d'inoculation 10% (Taleghani et al., 2016). Un inoculum de 2-4% (v / v) a été considéré comme optimal pour atteindre la production maximale d'acide lactique par *Lb casei* (Panesar et al., 2010). Aboseidah et al., (2017) ont rapporté que la production de l'acide lactique augmente considérablement lorsque le taux d'inoculation atteint 5%. Guha et al., (2013) ont également rapporté que la production maximale de l'acide lactique a été obtenu à un taux d'inoculation 4% (v/v).

L'utilisation d'un substrat particulier dépend de son prix, de sa disponibilité et de sa pureté. Ce travail a confirmé la faisabilité de l'utilisation des substrats végétaux pour remplacer les suppléments azotés coûteux tels que l'extrait de levure, l'extrait de viande et les peptones utilisés pour la formulation des milieux de culture pour la croissance des BL, et contribuer ainsi à éviter les problèmes inhérents à l'utilisation de sources d'azote d'origine animale. Les milieux optimisés dans cette étude sont d'une part à base de substrats végétaux locaux disponibles et moins coûteux et d'autre part adéquats pour la croissance des lactobacilles d'intérêt technologique. Leur composition est simple ; ces milieux se composent d'un nombre limité de constituants. Pour ces raisons, ils pourraient être utilisés pour la fermentation à grande échelle.



**Conclusion générale et
perspectives**

L'objectif principal de ce travail était la mise au point et l'optimisation des milieux de culture à base des jus végétaux des produits locaux pour la croissance de cinq lactobacilles : *Lb plantarum* BH14, *Lb brevis* CHTD27, *Lb rhamnosus*, *Lb farciminis* DSM 20184 et *Lb fermentum* DSM 20049 en utilisant l'approche statistique.

Les principaux résultats obtenus au cours de notre travail sont indiqués ci-dessous. En effet, le travail expérimental a été scindé en quatre parties :

La première étape fut donc de sélectionner le milieu de base pour le processus de l'optimisation. Trois jus végétaux (JPC, JFS, JC) ont été préparés selon un protocole bien déterminé. Puis, la croissance de *Lb plantarum* BH14 sur les différents jus végétaux seuls ou combinés a été estimée. La combinaison 50% de JPC et 50% de JFS a donné une meilleure croissance ; proche même à celle obtenue sur le milieu témoin. Cette combinaison a été retenue pour la suite du travail.

La deuxième partie a été basée sur l'optimisation de la composition du milieu de culture ainsi que les conditions de culture en utilisant l'approche statistique. Pour cela deux plans ont été utilisés :

Le premier (plan de Plackett et Burman) a été utilisé afin de déterminer les facteurs ayant un effet significatif sur la croissance des cinq lactobacilles. Six facteurs nutritionnels (glucose, lactulose, tween80, K_2HPO_4 , acétate de sodium et $MgSO_4$) et trois facteurs physiques (pH, agitation et taux d'inoculum) ont été utilisés. Les résultats ont montré la variabilité des exigences des lactobacilles. L'analyse statistique de ces résultats ont permis de sélectionner : le glucose, lactulose et $MgSO_4$ pour la croissance de *Lb plantarum* BH14, l'acétate de sodium et K_2HPO_4 pour *Lb brevis* CHTD27, acétate de sodium, $MgSO_4$ et le taux d'inoculation pour *Lb rhamnosus*, pH et taux d'inoculation pour *Lb farciminis* DSM 20184, tween80, $MgSO_4$ et pH pour *Lb fermentum* DSM 20049.

Le second plan (Box et Wilson) a été utilisé pour la détermination des optima. Ce plan a permis d'établir la composition du milieu optimal pour chaque lactobacille :

Lb plantarum BH14 : JPF + 11,59 g l⁻¹ de glucose, 11,59 g l⁻¹ de lactulose et 0,23 g l⁻¹ de $MgSO_4$.

Lb brevis CHTD27 : JPF + 8,03 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 1,67 g l⁻¹ de K_2HPO_4 .

Lb rhamnosus : JPF + 0,7 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 0,11 g l⁻¹ $MgSO_4$ et un taux d'inoculation de 1,3%.

Lb farciminis DSM 20184 : JPF + un pH de 6,81 et un taux d'inoculation de 4%.

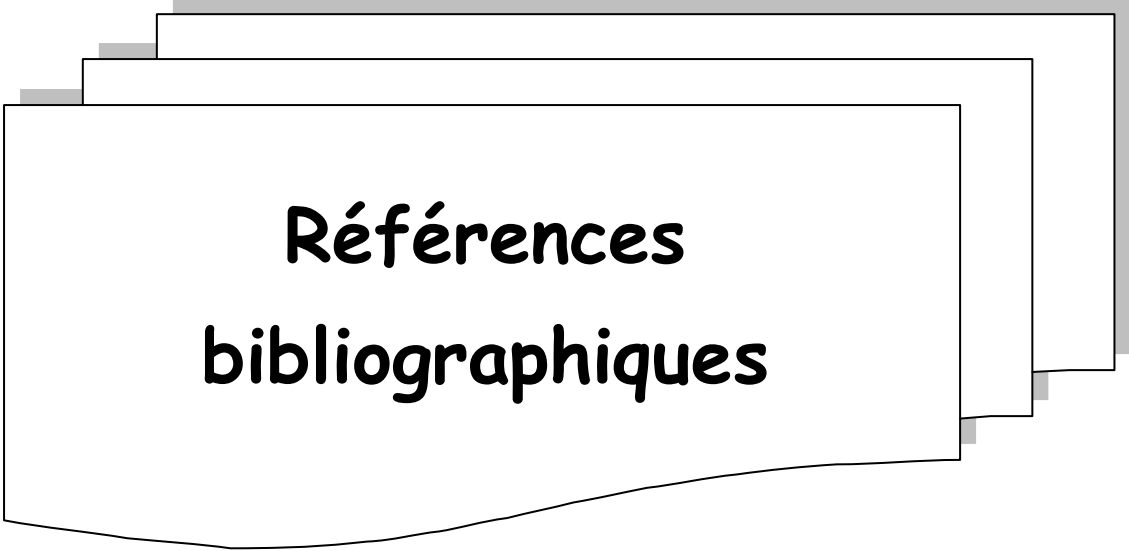
Lb fermentum DSM 20049 : JPF + 0,55 ml l⁻¹ de tween80, 0,27 g l⁻¹ de $MgSO_4$ et un pH de 6,3.

La troisième partie a été consacrée à la comparaison de la croissance de chaque *Lactobacillus* sur son milieu approprié et le milieu MRS végétal témoin. Les résultats ont montré la fiabilité des milieux élaborés qui ont donné des croissances meilleures à celles obtenues sur le milieu témoin.

La dernière partie consiste à l'étude de la cinétique de la croissance de chaque lactobacille sur le milieu optimisé. La croissance bactérienne, pour les cinq souches de lactobacilles se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue.

Finalement, l'objectif du travail est atteint. Néanmoins, le sujet est loin d'être épuisé. En effet, à la suite de ce travail, les perspectives envisagées pour cette étude sont diverses:

- ✓ Utiliser ce milieu pour d'autres bactéries lactiques comme les lactocoques et les leuconostocs, en l'optimisant éventuellement.
- ✓ Tester ce milieu pour des cultures mixtes, en vue de mettre en évidence les interactions interbactériennes (inhibitions, stimulations).
- ✓ Tester le milieu en conditions de fermenteur.
- ✓ S'orienter dans le sens de la production des métabolites en utilisant ce milieu.
- ✓ Valoriser d'autres produits végétaux locaux afin de mettre en évidence de nouvelles formulations de milieu de culture en utilisant l'approche statistique.



**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

- Aboseidah, A. A., Rasmey, A. M., Osman, M. M., Kamal, N. et Desouky, S.G.** 2017. Optimization of lactic acid production by a novel strain, *Enterococcus faecalis* KY072975 isolated from infants stool in Egypt. *European Journal of Biological Research* 7 (1): 22-30.
- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T. M. et Paalme, T.** 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* 85: 171–183.
- Aguirre-Ezkauriatza, J., Aguilar-Yáñez, J.M., Ramírez-Medrano, A. et Alvarez, M.M.** 2010. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology* 101: 2837–2844.
- Ahmed-Gaid, K., Boukhemis, M. et Djeghri-Hocine, B.** 2016. A low cost medium containing chicken intestine autolysate for *Lactobacillus brevis* growth: Statistical optimization. *Advance Journal of Food Science and Technology* 10(9): 642-647.
- Akbas, M. Y. et Ozdemirb, M.** 2008. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology* 25: 386–391.
- Alexandre, H., Grandvalet, C., Guillouxs-Bénatier, M., Remize-Barnavon, F. et Tourdot-Marechal, R.** 2008. Les bactéries lactiques en œnologie. *Lavoisier*. p 9.
- Altaf, M., Naveena, B. J. et Reddy, G.** 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation. *Food Technol Biotechnol* 43 (3): 235–239.
- Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Vijay Kumar, E. et Reddy, G.** 2006. Single step fermentation of starch to L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – Optimization by RSM. *Process Biochemistry* 41 : 465–472.
- Amrane, A. et Prigent, Y.** 1999. Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth production phases of *Lactobacillus helveticus*. *J Chem Technol Biotechnol* 74: 33-40.

Ashraf, R. et Shah, N. P. 2011. Selective and differential enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt- a review. *International Journal of Food Microbiology* 149:194-208.

Atlan, D., Béal, C., Champonier-Vergès, M.C., Chapot-Chartier, M.P., Chouayekh, H., Coccagn-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 Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier* : 271-447.

Axelsson, L. 2004. Classification and physiology. In Salminen S., Wright, A.V. et Ouwehand, A., lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 3^{ème} Ed., *Marcel Dekker* : 1-66.

Badel, S., Bernardi, T. et Michaud, P. 2011. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 29(1): 54-66.

Beal, C. et Corrieu, G. 1991. Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnol. Bioeng* 38: 90– 98.

Béal, C., Louvet, P. et Corrieu, G. 1989. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure culture of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl Microbiol Biotechnol* 32: 148-154.

Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F. et Obert, J.P. 2008. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques In Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier* : 661-766.

Bekal, S., Belguesmia, Y., Drider, D. et Prevost, H. 2009. Métabolisme des bactéries lactiques : le citrate. In Drider, D. et Prévost, H., Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica* : 51-70.

Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z. et Amrane, A. 2013. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by

Aspergillus oryzae. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 : 377–385.

Ben-Kun, Q., Ri-Sheng, Y., Min, L. et Sheng-Song, D. 2009. Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 31(1) : 85-89.

Berg, C.C. 2003. *Flora malesiano* precursor for the treatment of Moraceae 1: The mainsubdivision of *Ficus*: The subgenera. *Blumea* 48:167-78.

Berrougui, H. 2007 . Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express* 5 : p 20.

Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y., Pareilleux, A., 1988. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 340– 344.

Box, G.E.P. et Wilson, K.B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy Stat.Soc* 13: 1-45.

Brossard, H., Leyral, G. et Terry, O. 1997. Activité technologique en microbiologie. *Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine*. p 143.

Butel, M .J. Les probiotiques et leur place en médecine humaine. 2014. *Journal des Anti-infectieux* 16 (2) : 33-43.

Cachon, R., Antérieux, P. et Diviès, C. 1998. The comparative behavior of *Lactobacillus lactis* in free and immobilized culture processes. *J Biotechnol* 63 : 211-218.

Calderon, M., Loiseau, G. et Guyot, J.P. 2001. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology* 90 : 508-516.

Canteri G. 1997. Les levain lactiques *In* Eck, A. et Gillis, J.C., le fromage : de la science à l'assurance qualité. Lavoisier . p 192.

- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T. et Ávila, M.** 2011. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *International Journal of Food Microbiology* 149: 81–87.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. et Webb, C.** 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology* 92: 851–859.
- Cochu, A., Fourmier, D., Halasz, A. et Hawari, J.** 2008. Maple sap as a rich medium to grow probiotic lactobacilli and to produce lactic acid. *Letters in Applied Microbiology* 47: 500–507.
- Coelho, L. F., de Lima, C. J. B., Rodovalho, C. M., Bernardo M. P. et Contiero, J.** 2011. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses :optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28: 27 – 36.
- Coélet V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M, Vernoux J.P.** 2003. Isolation , characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le lait* 83: 269-306.
- Dagnelie, P.** 2000. La planification des expériences : choix des traitements et dispositif expérimental. *Journal de la société française de statistique* 141 : 5-29.
- Dave, R.I. et Shah, N.P.** 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. *J. Dairy Sci* 79: 1529-1536.
- Dave, R.I. et Shah, N.P.** 1997. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter culture. *Int Dairy J* 7: 435-443.
- de Man, J.C., Rogosa, M. et Sharpe M.E.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.

Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C. et Bingen, E. 2007. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Elsevier Masson*.

Derradji, Z., Djeghri- Hocine, B., Amrane, A., Melouka, H. et Djabbar, R. 2016. Effect of protein hydrolysates added to date juice on the growth of lactic acid bacteria. *Advances in Environmental Biology* 10 (1): 214-220.

Desmazeaud, M. 1983. l'état de connaissance en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*. p 271, 286-290.

Desmazeaud, M. 1983. Nutrition of lactic acid bacteria: state of the art. *Lait* 63:267–316.

Desmazeaud, M. 1992. Les bactéries lactiques in Hernier, J., Lenoir, J. et Webert , Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Lavoisier. p 9-57.

Djeghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N. et Amrane, A. 2006. Horse bean extract for the supplementation of lactic acid bacteria culture media. *J. Food Technol* 4(4): 299-302.

Djeghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N. et Amrane, A. 2007a . Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea- and chickpea-based media. *World J Microbiol Biotechnol* 23:765–769.

Djeghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N. et Amrane, A. 2007b. Evaluation of delipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol* 60(4): 292-296.

Djeghri-Hocine, B., Boukhemis, M. et Amrane, A. 2010. Formulation and evaluation of a selective medium for lactic acid bacteria-validation on some dairy products. *Am. J. Agric. Biol. Sci* 5: 148-153.

Doré, C. et Varoquaux, F. 2006. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées *Cemagref, Cirad, Ifremer*. p 585.

Doymaz I. 2005. Sun drying of figs: an experimental study. *Journal of Food Engineering* 71: 403–407.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem* 28: 350–360.

Elliker, P.R. , Anderson, A.W . et Hannesson, G. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and Lactobacilli . *J. Dairy Sci* 39: 1611-12.

FAO and WHO. 2006. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (October 2001) (Argentina).

Fitzpatrick, J. J. et Keeffe, U. O. 2001 .Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Proc. Biochem* 37: 183-186.

Foucaud, C., Francois, A., et Richard, J. 1997. Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 301-304.

Gao, X., Qiao, S.Y. et Lu, W.Q. 2009. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Applied Microbiology* 49: 556–561.

Garrity, G. M., Bell, J.J. A. et Lilburn, T. G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{ème} ed . *Spinger*. p 190.

Gaudreau, H., Renard, N., Champagne, C.P. et Van Horn Can D. 2002.The evaluation of mixtures of yeast and potato extracts in growth media for biomass production of lactic cultures. *Microbiol* 48: 626-634.

Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D. et Danova, S. 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* , isolated from traditional white cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23: 861-865.

Givry, S. et Duchiron, F. 2008. Optimization of Culture Medium and Growth Conditions for Production of L-Arabinose Isomerase and D-Xylose Isomerase by *Lactobacillus bifementans*. *Microbiology* 77 (3): 281–287.

Goupy, J. 2006. Les plans d'expérience. *MODULAD* 34 : 74-116

Gournier-Château, N., Larpent, J.P., Castellanos, M.I., Larpent, J.L. 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *Édition Technologie et documentation. Lavoisier*. p 1-192.

Guha, A., Banerjee, S. et Bera, D. 2013. Production of lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbrucki*. *IJRET*.: 630-634.

Guiraud, J.P. (2003). *Microbiologie Alimentaire*. Tec & Doc, Dunod. Paris.pp. 90-292.

Hammes, W.P., Weiss, N. et Holzapfel, W. 1991. The genera of *Lactobacillus* and bacterium. *In*: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. et Schleifer, K.H., the Prokaryotes. *Springer* . Vol. II: 1535-1594.

Han, B., Zhang, R., Yu, Z., Liu, B. et Ma, Q. 2011. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. *Afr. J. Microbiol. Res* 5: 1147-1155.

Hanoune, S., Djeghri-Hocine, B., Kassas, Z., Derradji, Z., Boudour, A. et Boukhemis, M. 2015. Optimization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 Growth on Whey and Lupin Based Medium Using Response Surface Methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology* 9 (9): 679-685.

Holland, R., Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M. et Norris, G. 2004. Esterases of lactic acid bacteria and chees flavor: milk fat hydrolysis vs alcoholysis. *International dairy journal* : 711-718.

Horn, S.J., Aspino, S.I. et Eijsink V.G.H. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1082–1089.

Hutkins, R.W. et Nannen, N.L. 1993. pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *J Dairy Sci* 76:2354-2365.

Hwang, C. F., Chang, J.H., Hwang, J. Y., Tsai, C. C., Lin, C.K. and Tsen, H. Y. 2012. Optimization of medium composition for improving biomass production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 using the Taguchi Array design and the Box-Behnken method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17: 827-834.

Janick, J., Paull, R.E. 2008. The Encyclopedia of Fruit and Nuts. *CABI Publishing*. p. 954.

- Juárez Tomás, M.S., Bru, E., Wiese, B., Nader-Macías, M.E.** 2010. Optimization of Low-Cost Culture Media for the Production of Biomass and Bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* Strain. *Probiotics & Antimicro. Prot* 2:2–11.
- Kalagridou-Vassiliadou, D.** 1984. Lypolytic activity and heat resistance of extracellular lipase of some Gram⁺ bacteria. *Milchwiss* 84 : 601-603.
- Kassas, Z., Hanoune, S. et Djeghri Hocine, B.** 2009. Evaluation de la croissance de quatre lactobacilles sur MRS végétal modifié. Mémoire Master. Université bedji Mokhtar Annaba
- Kneifel, W., Rajal, A., et Kulbe, K. D.** 2000. In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12: 27–34.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B. et AJMI, D.** 1994. Mécanisme du transport des nutriments dans bactéries lactiques In : De Roissart, H. et Luquet, F. M., Bactéries lactiques. *Lorica, uriage* 1 : 209-238.
- König, H. et Fröhlich, J.** 2009. Lactic acid bacteria In König, H., Uden, G. et Fröhlich, J., biology of microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* : 3- 24.
- Kontula, P., Nollet, L., Saarela, M., Vilpponen-Salmela, T., Verstraete, W., Mattila-Sandholm, T. et von Wright, A.** 2002. The Effect of Lactulose on the Survival of *Lactobacillus rhamnosus* in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and *in vivo*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14: 90–96.
- Kontula, P., Suihko, M.-L., von Wright, A., et Mattila-Sandholm, T.** 1999. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 82, 249–256.
- Krzywonos, M. et Eberhard, T.** 2011. High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. *Electronic Journal of Biotechnology* 14 (2).
- Kurbanoglu, E.B.** 2004. Enhancement of lactic acid production with ram horn peptone by *Lactobacillus casei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 37-42.
- Larpent, J.P.** 1996. les bactéries lactiques In : Bourgeois, C.M., Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentation alimentaire. *Tec et Doc Lavoisier*. p 4.

- Larpent J.P.** 1997. Microbiologie alimentaire Technique de laboratoire. *Tec et Doc, Lavoisier* : 792-795.
- Lechiancole, T., Ricciardi, A., Parente, E.** 2002. Optimization of media and fermentation conditions for the growth of *Lactobacillus sakei*. *Ann. Microbiol* 52: 257-274.
- Leclerc, H.** 1975. Microbiologie générale. *Doin* . p 106 ,108.
- Le coq, R.** 1965. Manuel d'analyse alimentaires d'expertises usuelles. *Doin*. Paris.
- Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbé, K. et De Vuyst, L.** 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J Appl Microbiol* 84: 159-168.
- Leroy, F. et De Vuyst, L.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentationIndustry. *Trends in Food Science & Technology* 15: 67–78.
- Leveau, J. Y., De Roissart, H. et Bouix, B.** 1986. La flore lactique. p 155, 157, 161.
- Leveau, J. Y. et Bouix, B.** 1993. Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec et Doc, Lavoisier*. p 170, 171, 195, 199, 203,211.
- Li, K.Y.** 2004 Fermentation: principles and microorganisms *In*: Hui, H.Y., Ghazala, S., Graham, D.M., Murrell, K.D., Nip, K.W, handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. *CRC Press*: 685-701.
- Linsberger-Martin, G., Weiglhofer, K., Phuong, T. et Berghofer, E.** 2013. High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT - Food Science and Technology* 51 : 331-336.
- Loubière, P. et Coccagn-Bousquet, M.** 2009. Métabolisme des bactéries lactiques. In Drider, D. et Prévost, H., Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica*: 29-46.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193 (1): 265–275.
- Lücke, F.K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meats. *Meat Science* 56: 105–115.

- Martin, L. G., Weiglhofer, K., Phuong, T. et Berghofer, E.** 2013. High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT - Food Science and Technology* 51: 331-336.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E. et Elliker, P.R.** 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed strain starter cultures . *J.Dairy Sci* 45: p 655.
- McDonald, L. C., Fleming, H. P., et Hassan, H. M.** 1990. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology* 56 (7): 2120-2124.
- Meslay, C. et Delarozière, M. F.** 2007. Herbière méditerranéenne. *Édisud*. p 9.
- Messens, W., et De Vuyst, L.** 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdough—a review. *International Journal of Food Microbiology* 72: 31–43.
- Metchnikoff, E.** 1908. The prolongation of life: optimistic studies. New York and London: G.P. Putnam's Sons ed.
- Monnet, C., Latrille, E., Béal, C. et Corrieu, G.** 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques *In* Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier*. p : 511, 593.
- Monnet, V.** 2009. Métabolisme des bactéries lactiques : les acides aminés. *In* Drider, D. et Prévost, H., Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica* : 15-26.
- Naveena, B.J., Altaf, Md., Bhadriah, K. et Reddy,G.** 2005. Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technology* 96:485–490.
- Nyabyenda, P.** 2005. Les plantes cultivées en région tropicales d'altitude d'Afrique. *Les presses agronomiques de Gembloux* : 62-63.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. et Shimizu, S.** 2005. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* : 100(4), 355-364.

- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. et Anthony, S.** 2009. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>)
- Panesar, P. S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. et Kosseva, M.** 2010. Production of L (+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (1): 219-226.
- Piard, J.C. et Desmazeaud, M.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.. oxygen metabolites and catabolism end-product. *Lait* 71: 525-541.
- Piga, A., Pinna, I.I., Kamer, B., Ozer., Agabbio, M. et Aksoy, U.** 2004. Hot air dehydration of figs (*Ficus carica* L.): drying kinetics and quality loss. *International Journal of Food Science and Technology* 39:793–799.
- Pilet, M. F., Magras, C. et Federighi, M.** 1998. bactéries lactiques in L.Sutra, M.Federighi. Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica* : 235-258.
- Plackett, R.L. et Burman, J.P.** 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33: 305-325.
- Pot, B.** 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria In Corrieu, G. et Luquet, F.M., bactéries lactiques de la génétique aux ferments. *Tec & Doc, Lavoisier.* p : 42.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D.A.** 2003 .Microbiologie. *De boeck.* p 104, 105.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y.J., Yun, J.S. et Ryu, H.W.** 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through plackett-burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol* 99: 2242-2249.
- Reid, G. et Burton, J.** 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria.. *Microbes and Infection* 4: 319-324.
- Reiter, B. et Oram, J.D.** 1962. vitamin and amino acid requirements of single strain starters *J. Dairy Res* .p 29, 63- 77.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A et Wiseman, R.F .** 1951. A selective medium for isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli* . *J. Bacteriol.* p 62, 132-133.

- Rosso L., Lobry, J.R., Bajards et Flandrois, J.P.** 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth . *Appl .Environ . Microbiol* 61: 610-6.
- Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., et Coffey, A.** 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology* 11:96–104.
- Saarela, M., K. Hallamaa, T. Mattila-Sandholm and J. Matto,** 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus strains*. *Int. Dairy J.*, 13: 291-302.
- Saeed A., Hayek, Salam A. et Ibrahim.** 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* 4 : 73-87
- Saelee, N. et Sriroth, K.** 2014. Optimization of nutrients in fermentative lactic acid production using oil palm trunkjuice as substrate. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 5: 957-965.
- Saguir, F.M. et de Nadra, M.C.** 2007. Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Curr Microbiol* 54: 414–418.
- Sawatari, Y., Hirano, T., et Yokota, A.** 2006. Development of food grade media for the preparation of *Lactobacillus plantarum* starter culture. *J. Gen. Appl. Microbiol* 52 : 349–356.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T. et de Vos, W.** 2005. Probiotic and other functional microbes : from markets to mechanisms. *Curr. Opin . Biotechnol* 16: 204-211.
- 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. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- Shankar, P.A. et Davies, F.L.** 1977. *J. Soc. DairyTechnology.*. p 30, 28-30.

Slatnar, A., Klancar, U., Stampar, F. et Veberic, R. 2011. Effect of Drying of Figs (*Ficus carica L.*) on the Contents of Sugars, Organic Acids, and Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9 : 6-21.

Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A.J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R.J., Ford, R., Coyne, C.J., Maxted, N., Ambrose, M.J., Ellis, N.T.H. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9: 4–18.

Soomro, A.H., Masud, T. et Anwaar, K. 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health– A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1: 20-24.

Stiles, M.E. et Holzapfe, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomyInternational. *Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

Takao, L., Uchimura, T. et Komagata, K. 2002. The effect of sodium acetate on the growth yield, the production of L- and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071^T and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^T. *J. Gen. Appl. Microbiol* 48 : 91–102

Taleghani, H.G., Najafpour, G. N. et Ghoreyshi, A.A. 2016. A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. *Polish Journal of Chemical Technology* 18 (1) 58—63.

Terzaghi, B. et Sandine, W. F. 1975. Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol* 29: 807-813.

Teuber, M. 1994. Lactic acid bacteria. *Biotechnology* 1: 325-364.

Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D., Francke, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J. and Smid, E.J. 2006. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *J Biol Chem* 281: 40041–40048.

Thomas, L. V., Clarkson, M. R., et Delves-Broughton. 2000. Nisin. In Naidu, A. S., Natural food antimicrobial systems. *CRC Press, Boca Raton* :463–524.

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

Tinsson, W. 2010. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et Applications, *Springer* Vol. 67.

Tortora, G., Case, C. et Funke, B. 2003. Introduction à la microbiologie. *Pearson Education* .p 178, 180.

van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G., et Siezen, R. J. 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111–121.

Vazquez, J.A., Docasal, S.F., Prieto, M.A. Gonzalez, M.A. et Murado, M.A. 2008. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-salige of fishing by-products. *Bioresource Technol* 99: 6246-6257.

Vinson, J. A. 1999. The functional food properties of figs. *Cereal foods world* 44 (2): 82-87.

Vogel, R. F., Pohle, B. S., Tichaczek, P. S., & Hammes, W. P. 1993. The competitive advantage of *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in sausage fermentations is caused by formation of curvacin A. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 457–462.

Von Wright, A. et Axelsson, L. 2012. Lactic acid bacteria: An introduction. In Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A. et Ouwehand, A., Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *CRC Press*:1-17

Wegkamp, A., Teusink, B., de Vos, W.M. et Smid, E.J. 2010. Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology* 50 : 57–64.

Weiss. N., Schillinger, U. et Kandler, O. 1983. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanii* and *Lactobacillus bulguricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* comb. nov and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulguricus* . *Syst. Appl. Microbial* 4: 552-557.

Weymarn, N.V., Hujanen, M. et Leisola, M. 2002. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry* 37 :1207–1213.

Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. et Feng, X. 2008. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem. Eng. J* 39: 496-502.

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

- **Anonyme 1:** [www.solabia.fr/solabia/...nsf/0/.../\\$file/FT_BK176_v5.pdf](http://www.solabia.fr/solabia/...nsf/0/.../$file/FT_BK176_v5.pdf)

- **Anonyme 2:** <http://www.helgilibrary.com/indicators/pea-production-green/algeria>



Annexes

ANNEXE 1

Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe, 1960) : utilisé pour le dénombrement des lactobacilles

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	1g
Sulfate de magnésium.....	0.1g
Sulfate de manganèse.....	0,05g
Phosphate dipotassique.....	2g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée.....	1000ml
Agar.....	13g

pH= 6,5

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

ANNEXE 2

Dosage des cations

La torche à plasma est une méthode physique d'analyse chimique (rattachée à la photométrie d'émission atomique). La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions par une sorte de flamme extrêmement chaude. L'échantillon pénètre généralement dans le plasma sous une forme condensée et doit donc subir les changements d'états suivants : fusion (pour les solides), vaporisation, ionisation. L'introduction a lieu au centre du plasma.

Les ions sont ensuite injectés dans l'analyseur, puis détectés. La technique utilise le fait que chaque élément nécessite une quantité unique d'énergie pour transférer à un état excité et que les différentes longueurs d'onde de la lumière ont des énergies différentes.

ANNEXE 3

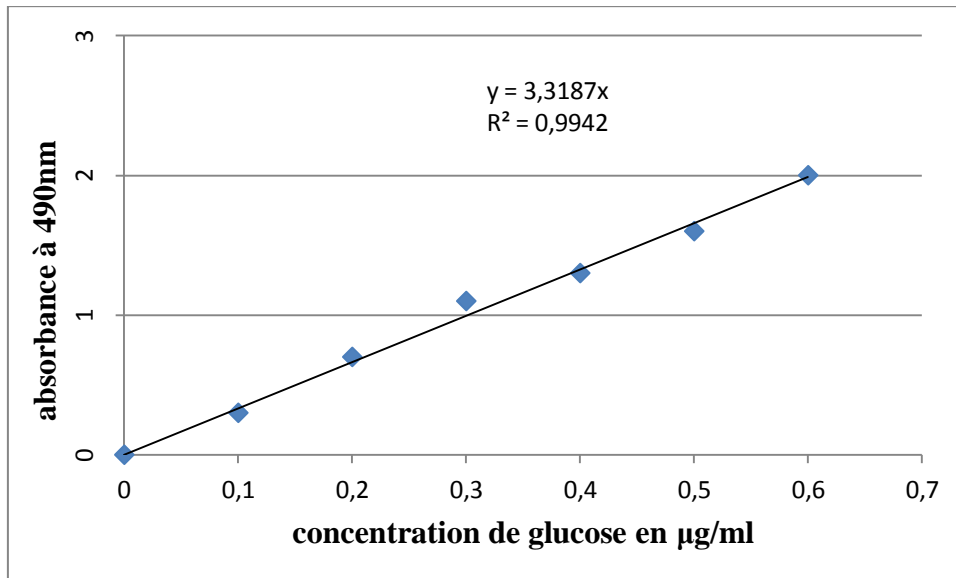


Figure b : La courbe d'étalonnage de glucose

ANNEXE 4

Réactifs utilisé pour le dosage des protéines

Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0,1N) ;

Solution B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée ;

Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans l'eau distillée ;

Solution M : 1 ml de solution C + 1 ml de solution B + 20 ml de solution A ;

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au $1/10^{\text{ème}}$.

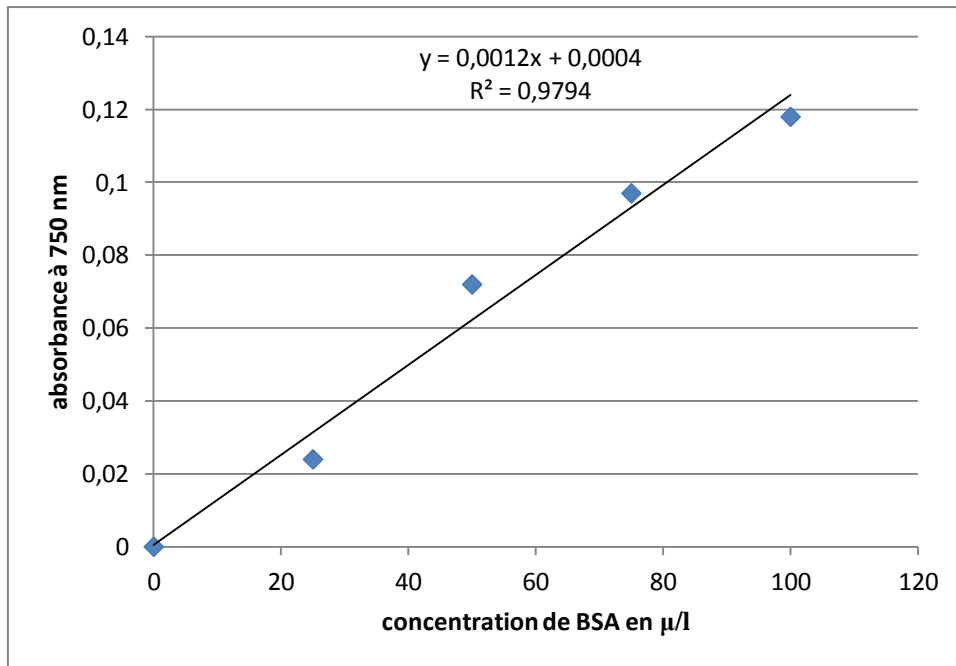


Figure 2 : La courbe d'étalonnage des protéines



Résumés

LE RÉSUMÉ

L'élaboration des milieux de culture fiables et moins coûteux pour la croissance de BL présente un intérêt grandissant. La croissance de *Lb plantarum* BH14 sur trois jus végétaux (JPC, JFS, JC) seuls ou combinés a été testée afin de sélectionner le milieu de base. La combinaison 50% de JPC et 50% de JFS donné une meilleure croissance et a été sélectionnée pour la suite de l'optimisation.

Le plan de Plackett et Burmun a été utilisé afin de déterminer les facteurs ayant un effet significatif sur la croissance des cinq lactobacilles. Six facteurs nutritionnels (glucose, lactulose, tween80, K_2HPO_4 , acétate de sodium et $MgSO_4$) et trois facteurs physiques (pH, agitation et taux d'inoculum) ont été utilisés. Les résultats ont permis de sélectionner : le glucose, lactulose et $MgSO_4$ pour la croissance de *Lb plantarum* BH14, l'acétate de sodium et K_2HPO_4 pour *Lb brevis* CHTD27, acétate de sodium, $MgSO_4$ et le taux d'inoculum pour *Lb rhamnosus*, pH et taux d'inoculum pour *Lb farciminis* DSM 20184 , tween80, $MgSO_4$ et pH pour *Lb fermentum* DSM 20049. Le second plan (Box et Wilson) a été utilisé pour la détermination des optima. Ce plan a permis d'établir la composition du milieu optimal pour chaque lactobacille : *Lb plantarum* BH14: JPF + 11,59 g l⁻¹ de glucose, 11,59 g l⁻¹ de lactulose et 0,23 g l⁻¹ de $MgSO_4$. *Lb brevis* CHTD27: JPF + 8,03 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 1,67 g l⁻¹ de K_2HPO_4 . *Lb rhamnosus* : JPF + 0,7 g l⁻¹ d'acétate de sodium, 0,11 g l⁻¹ $MgSO_4$ et un taux d'inoculation de 1,3%. *Lb farciminis* DSM 20184 : JPF + un pH de 6,81 et un taux d'inoculation de 4%. *Lb fermentum* DSM 20049: JPF + 0,55 ml l⁻¹ de tween80, 0,27 g l⁻¹ de $MgSO_4$ et un pH de 6,3. La croissance de chaque lactobacille sur le milieu approprié était meilleure à celle obtenue sur le milieu MRS végétal témoin.

Ces résultats montrent la faisabilité de l'utilisation des substrats végétaux locaux pour substituer les composants coûteux du MRS végétal et obtenir des bons rendements de croissance des lactobacilles.

MOTS CLÉS : *Lactobacillus*, milieu de culture, optimisation, substrats végétaux, plan d'expérience, MRS végétal.

ABSTRACT

The development of effective and less expensive media for the growth of lactic acid bacteria is of growing interest. The growth of *Lb plantarum* BH14 on three vegetal juices (JPC, JFS, JC) alone or in combination was tested in order to select the base medium. The combination of 50% JPC and 50% JFS gave better growth and was selected for further optimization.

Plackett and Burmun design was used to determine the factors having a significant effect on the growth of the five lactobacilli. Six nutritional factors (glucose, lactulose, tween80, K_2HPO_4 , sodium acetate and $MgSO_4$) and three physical factors (pH, agitation and inoculum size) were used. The results allowed to select: glucose, lactulose and $MgSO_4$ for the growth of *Lb plantarum* BH14, sodium acetate and K_2HPO_4 for *Lb brevis* CHTD27, sodium acetate, $MgSO_4$ and inoculum size for *Lb rhamnosus*, pH and inoculum size for *Lb farciminis* DSM20184, tween80 $MgSO_4$ and pH for *Lb fermentum* DSM 20049. The second design (Box and Wilson) was used for the determination of optima. This design made it possible to determine the composition of the optimal medium for each *lactobacillus*: *Lb plantarum* BH14: JPF + 11.59 g l^{-1} glucose, 11.59 g l^{-1} lactulose and 0.23 g l^{-1} $MgSO_4$. *Lb brevis* CHTD27: JPF + 8.03 g l^{-1} of sodium acetate, 1.67 g l^{-1} of K_2HPO_4 . *Lb rhamnosus*: JPF + 0.7 g l^{-1} sodium acetate, 0.11 g l^{-1} $MgSO_4$ and an inoculum size of 1.3. *Lb farciminis* DSM20184: JPF + a pH of 6.81 and an inoculum size of 4%. *Lb fermentum* DSM 20049: JPF + 0.55 ml l^{-1} of tween80, 0.27 g l^{-1} of $MgSO_4$ and a pH of 6.3. The growth of each *lactobacillus* on the appropriate medium was better than that obtained on the control vegetal MRS medium.

These results show the feasibility of using the local vegetal substrates to substitute the expensive components of vegetal MRS medium and obtain good yields of *lactobacillus* growth.

KEY WORDS : *Lactobacillus*, growth media, optimisation, vegetal substrates, experimental design, vegetal MRS

ملخص

ان أهمية تطوير أوساط زرع ملائمة لنمو البكتيريا اللبنية و بأقل تكلفة في تزايد مستمر. لاختيار التركيبة القاعدية لوسط الزرع تم نمو *Lb plantarum* BH14 في ثلاثة أنواع من أوساط لمستخلصات نباتية لوحدها أو مختلطة حيث تم الحصول على أحسن نمو في الوسط الذي يحتوي 50% مستخلص البازلاء و 50% من مستخلص التين المجفف. تم اختيار هذا الوسط الأولي لبقية الدراسة.

المخطط Plackett et Burmaun استعمل لانتقاء العوامل المؤثرة على نمو خمسة سلالات من نوع *Lactobacillus*. استعملت ستة عوامل غذائية glucose ، lactulose ، acétate de sodium ، K_2HPO_4 ، MgSO₄ و tween 80 و ثلاثة عوامل فيزيائية pH ، agitation و taux d'inoculum ، أظهرت النتائج تأثير كل من : glucose ، lactulose ، و MgSO₄ على *Lb plantarum* BH14 ، acétate de sodium و K_2HPO_4 على نمو *Lb brevis* CHTD27 ، acétate de sodium ، MgSO₄ و taux d'inoculum على نمو *Lb rhamnosus* ، pH و taux d'inoculum على نمو *Lb farciminis* DSM 20184 و تأثير tween 80 ، MgSO₄ و pH على نمو *Lb fermentum* DSM 20049.

المخطط الثاني يتمثل في مخطط التركيبات المركزية Box et Wilson الذي سمح بتحديد القيم المثلى للعوامل المؤثرة و التي كانت كما يلي : glucose 11.59 غ/ل ، lactulose 11.59 غ/ل و 0.23 غ/ل MgSO₄ بالنسبة لـ *Lb plantarum* BH14 . 8.03 غ/ل acétate de sodium ، 1.67 غ/ل K_2HPO_4 بالنسبة لـ *Lb brevis* CHTD27 . 0.7 غ/ل acétate de sodium ، 0.11 غ/ل MgSO₄ و 1.3 % taux d'inoculum بالنسبة لـ *Lb rhamnosus* . pH 6.81 و 4% taux d'inoculum بالنسبة لـ *Lb farciminis* DSM 20184 . 0.55 مل/ل tween 80 ، 0.27 غ/ل MgSO₄ و pH 6.3 بالنسبة لـ *Lb fermentum* DSM 20049.

. نمو كل سلالة في الوسط الملائم لها كان أفضل من نموها في الوسط MRS النباتي.

هذه النتائج أثبتت نجاعة استعمال منتوجات نباتية محلية لتعويض المكونات المرتفعة التكلفة المستعملة في وسط الزرع النباتي MRS للحصول على نمو جيد لسلالات *Lactobacillus*.

الكلمات المفتاحية : *Lactobacillus* ، وسط زرع ، تحسين التخمرات ، مستخلصات نباتية ، مخططات تجريبية ، MRS نباتي.