



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR – ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUÉES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

En MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie Appliquée

THÈME

Valorisation de sous-produits d'abattoir en vue de leur utilisation comme substrats pour la formulation de milieux de culture pour certains lactobacilles

Présentée par : **Kelthoum AHMED-GAID**

Directrice de thèse : Mme. Messaouda BOUKHEMIS

Pr. Université d'Annaba

Membres de Jury :

Président : Mr. Boudjemaa SOUMATI

Pr. Université d'Annaba

Examineurs : Mme. Leila AOUN

Pr. Université d'El Tarf

Melle. Nedjoud GRARA

Pr. Université de Guelma

Melle. Akila ABDI

MCA. Université d'Annaba

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

"Louange à Allah qui nous a guidés à ceci. Nous n'aurions pas été guidés, si Allah ne nous avait pas guidés".

Al-A'raf. Verset 43.

*Je dois l'aboutissement de cette thèse à ma directrice **Pr. BOUKHEMIS Messaouda**. Je désire lui adresser un remerciement tout particulier pour son intérêt, sa disponibilité, son soutien, ses conseils, et surtout son écoute et sa compréhension tout au long de ces années passées.*

***Ma** reconnaissance et mes remerciements sont adressés au **Pr. SOUMATI Boudjema** qui m'a fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Je tiens à remercier **Pr. AOUN Leila** pour l'honneur qu'elle m'a accordée en acceptant d'être examinatrice de ma thèse.*

*Je remercie également **Pr. GRARA Nedjoud** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury en tant qu'examinatrice.*

*Je remercie très sincèrement **Dr. ABDI Akila** d'avoir donné de son temps si précieux pour examiner ce travail.*

*Mes remerciements s'étendent également au **Pr. LADJAMA Ali** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour la confiance et l'aide qu'il m'a accordées.*

Dédicace

Je dédie ce travail à mon père et ma mère,

Rachid et Rachida

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude
pour leur amour et leur soutien tout au long de mes études,*

que DIEU les bénisse.

A mes chers sœurs :

*Hadjer, Nour El Yakine, Chaima, Amina
et Zeineb.*

A mon fiancé Racuf

A toutes mes amies

Résumé

Les intestins de poulet et les sabots de mouton sont des sous-produits d'abattoir connus pour être riches en protéines, ceux-ci ont été valorisés pour être utilisés comme base afin de formuler des milieux de culture pour certaines souches de lactobacilles.

Pour extraire les fractions protéiques, les matières premières ont été soumises à deux types d'hydrolyses : chimique et enzymatique. Pour chaque hydrolysats, le degré d'hydrolyse ainsi que la capacité à supporter la croissance d'une souche de *Lb. plantarum* ont été évalués afin de choisir la méthode d'hydrolyse qui convient à chaque sous-produit.

L'hydrolysats autolytique des intestins de poulet (HAIP) et l'hydrolysats enzymatique des sabots de mouton (HESM) ont été sélectionnés pour formuler des milieux de culture pour quatre lactobacilles : *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* et *Lb. rhamnosus*.

L'optimisation a été réalisée en utilisant les plans d'expériences, elle comporte une première étape de criblage des paramètres du milieu (glucose, extrait de levure, citrate d'ammonium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, sulfate de manganèse, et tween 80) par le plan de Plackett et Burman (PPB) et une deuxième étape réalisée par le plan Composite Centré (PCC) et qui consiste en l'optimisation des paramètres sélectionnés par le PPB.

Les résultats d'analyse du PPB et du PCC ont permis de définir les formules exactes des milieux optimisés. Les milieux à base d'HAIP doivent contenir 19.15 g/L de glucose et 0.25 g/L de citrate d'ammonium pour la croissance de *Lb. brevis*, 20.82 g/L de glucose et 0.03 g/L de sulfate de manganèse pour la croissance de *Lb. plantarum*, 18.05 g/L de glucose et 2.70 g/L de citrate d'ammonium pour la croissance de *Lb. fermentum*, et 18.5 g/L de glucose uniquement pour la croissance de *Lb. rhamnosus*.

Pour les milieux à base de farine de sabots, en plus de l'HESM, *Lb. plantarum* exige 0.39 g/L de citrate d'ammonium et 17.29 g/L de glucose. Les souches de *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. fermentum* exigent 18.5 g, 17.5 g et 18 g de glucose par litre de HESM respectivement.

L'évaluation du potentiel maximal de croissance, de la cinétique de croissance ainsi que la vitesse spécifique de croissance sur les milieux ainsi optimisés et sur le milieu standard MRS ont montré de meilleurs résultats sur les deux hydrolysats par rapport au milieu MRS

commercial. En effet Mise à part la souche de *Lb. plantarum*, les trois autres souches préfèrent le milieu HESM supplémenté de glucose uniquement.

L'amélioration de la production de biomasse est couplée à une réduction des coûts de production des milieux optimisés par rapport au milieu commercial MRS réalisant un bénéfice compris entre 1300 et 1400 DA/ L.

Mots clés : Sous-produits d'abattoir, intestins de poulet, sabots de mouton, lactobacilles, hydrolyse, milieu de culture, MRS, coûts de production.

Abstract

Chicken intestines and sheep hooves are by-products known to be rich in proteins; those were valorized to be used as a basis to formulate growth media for some *Lactobacillus* strains.

To extract proteic fractions, raw materials were subjected to two types of hydrolysis: chemical and enzymatic. For each hydrolyzate, the degree of hydrolysis as well as the capacity to support the growth of a strain of *Lb. plantarum* was evaluated to select the appropriate hydrolysis method for each by-product.

The autolytic hydrolyzate of chicken intestine (HAIP) and the enzymatic hydrolyzate of sheep hooves (HESM) were selected to be used as a basis to formulate growth media for four lactobacilli: *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* and *Lb. rhamnosus*.

The optimization was carried out using the experimental designs which consists of a first step of screening of the media factors (glucose, yeast extract, ammonium citrate, potassium phosphate, magnesium sulfate, manganese sulfate, and tween 80) by the Plackett and Burman design (PPB), the second step realised by the Central Composite design (PCC) which includes the optimization of factors selected by the PPB.

The results of the analysis of the PPB and the PCC permit to define the exact formulas of the optimized media. On HAIP, media contain: 19.15 g / L of glucose and 0.25 g / L of ammonium citrate for *Lb. brevis*, 20.82 g /L of glucose and 0.03 g / L of manganese sulphate for *Lb. plantarum*, 18.05 g /L of glucose and 2.70 g /L of ammonium citrate for *Lb. fermentum* and only 18.5 g / L glucose for *Lb. rhamnosus*.

For sheep hooves-based media, in addition to the HESM, *Lb. plantarum* requires 0.39 g/ L of ammonium citrate and 17.29 g/L of glucose, while the strains: *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. fermentum* require 18.5, 17.5 and 18 g of glucose per liter of HESM respectively.

Evaluation of maximum growth potential, growth kinetics and specific growth rate on optimized media and on the standard MRS medium showed good results on the two hydrolysates compared to the MRS medium. In except the strain *Lb. plantarum*, the other strains prefer HESM medium supplemented with glucose only.

Amelioration of biomass production is accompanied with production costs reduction for the optimized media compared to the commercial medium MRS with a benefice of between 1300 and 1400 DA/ L.

Key words: Slaughterhouse by-products, chicken intestines, sheep hooves, *Lactobacillus*, hydrolysis, growth medium, MRS, production costs.

الملخص

تعتبر أمعاء الدجاج و أظلاف الغنم من مخلفات مذابح الحيوانات المعروفة بغناها بالبروتين، وقد تم استغلالها لتستخدم كأساس لصياغة أوساط نمو قليلة التكلفة لبعض سلالات *Lactobacillus*.

لاستخراج المستخلصات البروتينية، تُعرض المواد الأولية إلى نوعين من التحلل: كيميائي وأنزيمي. تم تقييم درجة التحلل والقدرة على دعم نمو سلالة *Lb. plantarum* لكل مُستخلص، وذلك لاختيار طريقة التحلل التي تناسب كل مادة.

تم اختيار مستخلص التحلل الذاتي لأمعاء الدجاج (HAIP) و مستخلص التحلل الانزيمي لأظفار الغنم (HESM) لاستخدامهما كأساس لصياغة أوساط نمو لأربعة عصيات لبنية: *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* و *Lb. fermentum*.

تم تطوير الأوساط باستخدام التصميم التجريبي و الذي يُنص على خطوة أولى و هي اختيار العناصر الأساسية لوسط النمو (الجلوكوز، خلاصة الخميرة، سترات الأمونيوم، فوسفات البوتاسيوم، كبريتات المغنيسيوم، كبريتات المنغنيز، وتوين 80) بواسطة تصميم Plackett et Burman، الخطوة الثانية تستخدم تصميم Composite Centré والذي يضم تحسين العناصر المختارة سابقا بواسطة تصميم Plackett et Burman. استُخدمت نتائج فحص التصميمين لتحديد الصيغ الدقيقة لأوساط النمو المطورة.

بالنسبة لمُستخلص أمعاء الدجاج، تحتوي الأوساط على: 19.5 غ/ل جلوكوز و 0.25 غ/ل سترات الأمونيوم لـ *Lb. brevis*، 20.82 غ/ل جلوكوز و 0.03 غ/ل كبريت المنغنيز لـ *Lb. plantarum*، 18.05 غ/ل جلوكوز و 2.7 غ/ل سترات الأمونيوم لـ *Lb. fermentum* و فقط 18.5 غ/ل جلوكوز لـ *Lb. rhamnosus*.

بالنسبة للأوساط التي أساسها أظلاف الأغنام، و بالإضافة إلى المُستخلص HESM، تتطلب *Lb. plantarum* 2.70 غ/ل من سترات الأمونيوم و 18.5 غ/ل الجلوكوز، أما سلالات *Lb. brevis* و *Lb. rhamnosus* و *Lb. fermentum* فهي تتطلب 18.5، 17.5 و 18 غرام من الجلوكوز في كل لتر من المستخلص على التوالي.

أظهر تقييم النمو الأقصى، حركية النمو ومعدل سرعة النمو في أوساط النمو المطورة و وسط النمو MRS نتائج جيدة على كلا المستخلصين مقارنة مع الوسط التجاري MRS.

باستثناء سلالة *Lb. plantarum*، السلالات الثلاث الأخرى فضلت مستخلص أظلاف الأغنام مع الجلوكوز فقط.

التحسن في إنتاج البكتيريا كان مرفوقا بإنخفاض في ثمن إنتاج أوساط النمو مقارنة بالوسط التجاري MRS مع تحصيل ربح يتراوح بين 1300 و 1400 دج/ل.

كلمات البحث: مخلفات المذابح، أمعاء الدجاج، أظلاف الغنم، عصيات الحليب، التحلل، وسط نمو، MRS، سعر.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I: Les sous-produits animaux	
1. Définition	3
2. Classification.....	3
2.1. Catégorie 1	3
2.2. Catégorie 2.....	4
2.3. Catégorie 3.....	4
3. Devenir des sous-produits animaux	5
3.1. Catégorie 01	5
3.2. Catégorie 02.....	5
3.3. Catégorie 03.....	5
4. Modes d'élimination des sous-produits animaux.....	6
4.1. Incinération.....	6
4.2. Enfouissement	6
4.3. Compostage	6
4.4. Fonte	6
5. Voies de valorisation.....	7
5.1. Production de biogaz	7
5.2. Production d'engrais.....	7
5.3. Alimentation humaine	7
5.4. Alimentation animale	8
5.4.1. Farines animales.....	8
5.4.2. Graisse	8
5.4.3. Pet Food.....	8
5.5. Fabrication de produits à haute valeur ajoutée	9
5.5.1. Le collagène	9
5.5.2. La colle.....	9

5.5.3. Les protéines hydrolysées	9
6. Problèmes liés aux sous-produits animaux	9
6.1. Effets sur l'homme	10
6.2. Effets sur l'environnement	10
7. Les sous-produits avicoles	10
8. Les sous-produits ovins.....	12

Chapitre II: Les bactéries lactiques

1. Définition et caractéristiques générales	13
2. Biotope.....	13
3. Taxonomie	13
3.1. Description du genre <i>Lactobacillus</i>	14
4. Métabolisme des bactéries lactiques	16
4.1. Métabolisme des sucres	16
4.2. Métabolisme de l'azote.....	16
4.3. Métabolisme du citrate	16
5. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	17
5.1. Exigences en source de carbone	17
5.2. Exigences en azote.....	17
5.3. Besoins en minéraux.....	18
5.4. Besoins en vitamines	18
6. Rôles des bactéries lactiques.....	18
6.1. Utilisation des bactéries lactiques en alimentation humaine et animale.....	18
6.1.1. Les bactéries lactiques et les produits laitiers	19
6.1.2. Les bactéries lactiques et les produits carnés	19
6.1.3. Les bactéries lactiques et les produits végétaux.....	20
6.1.4. Les bactéries lactiques et les produits de panification	20
6.1.5. Les bactéries lactiques dans la vinification	20
6.2. Bactéries lactiques dans le domaine de la santé	20

6.2.1.	Stimulation du système immunitaire par les bactéries lactiques	20
6.2.2.	Modulation de l'allergie	21
6.2.3.	Prévention de la diarrhée	21
6.2.4.	Effet sur la digestion du lactose	21
6.2.5.	Prévention de cancer	21
6.2.6.	Réduction du cholestérol	22
6.2.7.	Effet sur la dermatite atopique	22
6.2.8.	Effet sur la vaginose bactérienne.....	22
7.	Étude de quelques espèces de lactobacilles	23
7.1.	<i>Lactobacillus brevis</i>	23
7.2.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	23
7.3.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25
7.4.	<i>Lactobacillus fermentum</i>	25
Chapitre III: Les milieux de culture		
1.	Définition	27
2.	Classification.....	27
2.1.	La composition	27
2.2.	L'utilisation	27
3.	Milieux de culture des bactéries lactiques	28
4.	Formulation de nouveaux milieux de culture et leurs optimisations	29
4.1.	Formulation	29
4.2.	Optimisation	29
4.2.1.	Méthode classique « facteur par facteur ».....	31
4.2.2.	Méthodes avancées.....	31

Matériel et Méthodes

1.	Microorganismes.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1.	Origine	35
1.2.	Revivification et conservation des souches	35
1.3.	Préparation des milieux de culture pour la croissance des souches lactiques	35

1.4.	Préparation de l'inoculum et ensemencement	36
1.5.	Estimation du potentiel de croissance.....	36
1.5.1.	Sur milieu liquide	36
1.5.2.	Sur milieu solide.....	36
2.	Sous-produits d'abattoir.....	37
2.1.	Préparation des matières premières	37
2.1.1.	Préparation de la pâte d'intestins de poulet.....	37
2.1.2.	Préparation de la farine de sabots de mouton.....	37
2.2.	Préparation des hydrolysats	37
2.2.1.	Hydrolyse des intestins de poulet	37
2.2.2.1.	<i>Autolyse</i>	37
2.2.2.1.	<i>Hydrolyse enzymatique</i>	37
2.2.2.	Hydrolyse des sabots de mouton.....	37
2.2.2.1.	<i>Hydrolyse chimique</i>	37
2.2.2.1.	<i>Hydrolyse enzymatique</i>	37
2.3.	Étude de l'efficacité de la méthode d'hydrolyse	40
2.3.1.	Détermination du degré d'hydrolyse	40
2.3.2.	Croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur les milieux à base des différents hydrolysats ...	40
2.4.	Rendement d'hydrolyse	40
2.5.	Caractérisation physicochimique des matières premières et leurs hydrolysats	40
2.5.1.	Détermination de la matière sèche	40
2.5.2.	Détermination de la matière minérale	41
2.5.3.	Dosage des protéines totales.....	41
2.5.4.	Dosage des sucres totaux.....	41
2.5.5.	Dosages des lipides	42
2.5.6.	Dosage de l'azote total	42
3.	Formulation et optimisation des milieux de culture pour la croissance des souches lactiques:.....	42
3.1.	Sélection des paramètres du milieu influençant la croissance : Plan de Plackett et Burman	42
3.2.	Optimisation des milieux.....	44

3.3.	Analyse statistique	45
3.4.	Validation du modèle.....	46
4.	Comparaison de la croissance sur les milieux optimisés avec le milieu standard MRS...	46
4.1.	Cinétiques de croissance.....	46
4.2.	Vitesse spécifique de croissance.....	46
5.	Estimation approximative des coûts de production	47
5.1.	Coût de production d'un litre de chaque hydrolysât.....	47
5.1.1.	Consommation d'énergie	47
5.1.2.	Consommation d'eau.....	47
5.1.3.	Coût des intrants.....	47
5.2.	Coût de production d'un litre de chaque milieu	47
6.	Analyse statistique	47

Résultats et Discussion

1.	Caractérisation physicochimique de la pâte d'intestins et de la farine de sabots	47
2.	Efficacité de la méthode d'hydrolyse.....	47
2.1.	Degré d'hydrolyse dans les quatre hydrolysats	47
2.2.	Croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur les quatre hydrolysats	49
2.2.1.	Sur milieu liquide.....	49
2.2.2.	Sur milieu solide.....	49
3.	Composition physicochimique des hydrolysats choisis	51
4.	Rendement d'hydrolyse	51
5.	Formulation des milieux	52
5.1.	Milieux pour <i>Lactobacillus brevis</i>	52
5.1.1.	Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB	52
5.1.2.	Optimisation par le PCC	57
5.2.	Milieux pour <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
5.2.1.	Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB	61
5.2.2.	Optimisation par le PCC	65
5.3.	Milieux pour <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	72

Table des matières

5.3.1.	Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB	72
5.3.2.	Optimisation des milieux	76
5.4.	Milieux pour <i>Lactobacillus fermentum</i>	77
5.4.1.	Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB	77
5.4.2.	Optimisation des milieux	81
6.	Cinétiques de croissance sur les milieux optimisés par comparaison au milieu témoin MRS	85
7.	Estimation des coûts de production	89
7.1.	Estimation des coûts de production des hydrolysats	89
7.2.	Estimation du prix d'un litre du milieu MRS synthétisé	89
7.3.	Estimation des coûts de production des milieux optimisés	90
	Discussion	91
	Conclusion et perspectives	95
	Références bibliographiques	97
	Annexes	119

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés fonctionnelles et bioactives des hydrolysats des différents sous-produits de poulet 11

Tableau 2: Organisation du genre *Lactobacillus* 15

Tableau 3: Milieux utilisés pour les bactéries lactiques 28

Tableau 4: Matrice d'expériences de Plackett et Burman (1946) pour onze facteurs..... 43

Tableau 5: Paramètres du milieu et leurs niveaux étudiés 44

Tableau 6: Plan composite centré à deux facteurs 45

Tableau 7: Caractérisation physicochimique de la pâte d'intestins de poulet et de la farine de sabots de mouton..... 47

Tableau 8: Influence de la méthode d'hydrolyse sur le degré d'hydrolyse..... 48

Tableau 9: Potentiel de croissance sur les différents hydrolysats 49

Tableau 10: Composition physicochimique des hydrolysats choisis 51

Tableau 11: Croissance de *Lb. brevis* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman 52

Tableau 12: Effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HAIP 53

Tableau 13: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HESM..... 54

Tableau 14: Croissance de *Lb. brevis* sur HAIP selon le plan composite central..... 57

Tableau 15: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP .. 58

Tableau 16: Croissance de *Lb. plantarum* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman 61

Tableau 17: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivée sur HAIP..... 62

Tableau 18: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivée sur HESM..... 63

Tableau 19: Croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP selon le plan composite central..... 65

Tableau 20: Croissance de *Lb. plantarum* sur HESM selon le plan composite central 66

Tableau 21: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP 67

Tableau 22: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM..... 67

Tableau 23: Croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman	72
Tableau 24: Effets des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> cultivé sur HAIP .	73
Tableau 25: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> cultivée sur HESM	74
Tableau 26: Croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman	77
Tableau 27: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb. fermentum</i> cultivée sur HAIP	78
Tableau 28: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de <i>Lb. fermentum</i> cultivée sur HESM	79
Tableau 29: Résultats de croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HAIP selon le plan composite central	81
Tableau 30: Coefficients de régression estimés pour la croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HAIP	82
Tableau 31: croissances optimales observée des quatre lactobacilles sur HAIP, HESM et MRS témoin.....	88
Tableau 32: Vitesses spécifiques de croissance des quatre souches sur les milieux : MRS, HAIP et HESM.....	88
Tableau 33: Estimation approximative du coût de production d'un litre de chaque hydrolysats (DA)	89
Tableau 34: Estimation approximative du coût de production d'un litre de milieu MRS	89
Tableau 35: Estimation approximative du coût de production d'un litre de milieu optimisé pour les différentes souches et bénéfice réalisé par rapport au prix d'un litre de MRS (DA) .	90

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des diverses techniques utilisées dans les études d'optimisation	30
Figure 2: Plan composite central pour trois facteurs	34
Figure 3: Plan Box-Behnken pour trois facteurs	34
Figure 4: Schémas d'obtention des hydrolysats : HAIP (a), HEIP (b), HCSM (c) et HESM (d)	39
Figure 5: Aspects visuels des quatre hydrolysats: HAIP, HEIP, HCSM et HESM.	48
Figure 6: Croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur les différents hydrolysats	49
Figure 7: Croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur les milieux solides à base des différents hydrolysats	50
Figure 8: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. brevis</i> cultivée sur HAIP.....	55
Figure 9: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. brevis</i> cultivée sur HESM.....	55
Figure 10: Courbe tridimensionnelle de la croissance de <i>Lb. brevis</i> sur HAIP	58
Figure 11: Graphique de contour de la croissance de <i>Lb. brevis</i> sur HAIP	59
Figure 12: Diagramme d'optimisation de la croissance de <i>Lb. brevis</i> sur HAIP.....	59
Figure 13: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de <i>Lb. brevis</i> sur HESM.....	60
Figure 14: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. plantarum</i> cultivé sur HAIP	64
Figure 15: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. plantarum</i> cultivé sur HESM.....	64
Figure 16: Courbe tridimensionnelle de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HAIP	68
Figure 17: Graphique de contour de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HAIP	69
Figure 18: Courbe tridimensionnelle de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HESM.....	69
Figure 19: Graphique de contour de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HESM.....	70
Figure 20: Diagramme d'optimisation de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HAIP	70
Figure 21: Diagramme d'optimisation de la croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur HESM	71
Figure 22: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> cultivé sur HAIP.....	75

Figure 23: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> cultivé sur HESM.....	75
Figure 24: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> sur HAIP et HESM.....	76
Figure 25: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. fermentum</i> cultivé sur HAIP	80
Figure 26: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de <i>Lb. fermentum</i> cultivé sur HESM	80
Figure 27: Courbe tridimensionnelle de la croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HAIP	83
Figure 28: Graphique de contour de la croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HAIP	83
Figure 29: Diagramme d'optimisation de la croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HAIP.....	84
Figure 30: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur HESM.....	84
Figure 31: Cinétique de croissance de <i>Lb. brevis</i> sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS.....	85
Figure 32: Cinétique de croissance de <i>Lb. plantarum</i> sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS	86
Figure 33: Cinétique de croissance de <i>Lb. rhamnosus</i> sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS	86
Figure 34: Cinétiques de croissance de <i>Lb. fermentum</i> sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS	87
Figure 35: Courbe d'étalonnage des protéines	120
Figure 36: Courbe d'étalonnage des sucres totaux.....	121

Liste des abréviations

BR : Bénéfice réalisé

Coef. : Coefficient

DO : densité optique

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ES Coef. : Erreur standard du coefficient

ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine

HAIP : hydrolysate autolytique des intestins de poulet

HCSM : hydrolysate chimique des sabots de mouton

HEIP : hydrolysate enzymatique des intestins de poulet

HESM : hydrolysate enzymatique des sabots de mouton

Lb : *Lactobacillus*

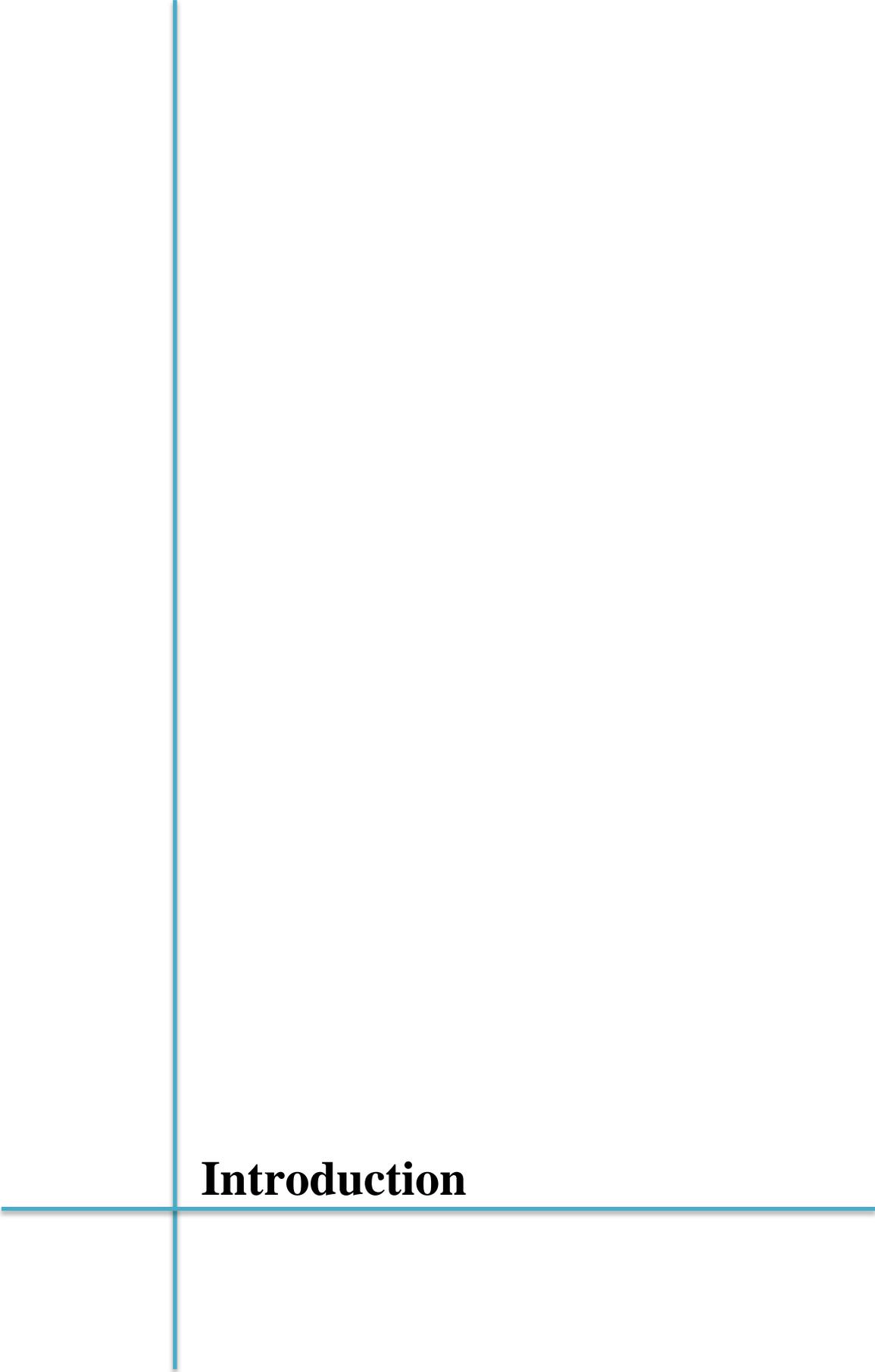
Lc : *Lactococcus*

MRS : milieu de Man, Rogosa et Sharpe

PCC : plan composite centré

PPB : Plan de Plackett et Burman

PR : Prix de revient



Introduction

Introduction

Le secteur de la viande a connu une très grande expansion de part le monde (Labioui *et al.*, 2007). Selon les estimations de la direction du développement de la production avicole au ministère de l'Agriculture, l'Algérien consomme en moyenne 14 kg de viande rouge et 15 kg de viande blanche par an (Mellak, 2016 ; Abachi, 2015). L'Algérie représente 3% de la production mondiale de la viande ovine, avec une croissance exceptionnelle de cette filière qui est passée de 19 millions têtes en 2005 à 26 millions têtes en 2015 (Allal, 2015). De même, l'aviculture a indéniablement enregistré un développement remarquable dès les années 1970 (Fenardji, 1990), elle a produit entre 350 et 475 mille tonnes de viande de volailles en 2013 (soit environ 240 millions de poulets par an) (Alloui, 2011).

Comme les humains consomment uniquement une portion des animaux destinés à l'alimentation, une partie importante de ceux-ci se transforme en déchets. Ces derniers constituent 46 à 50 % de chaque vache, 48 % de chaque mouton ou chèvre, 28 à 32 % de chaque poulet et 22 % de chaque dinde. Ces proportions sont ahurissantes, ce qui fait de l'industrie de la viande, une filière des plus polluantes (Labioui *et al.*, 2007).

L'utilisation des sous-produits animaux est difficile en raison de leur stabilité biologique inadéquate, de leur nature potentiellement pathogène, de leur teneur élevée en eau, de leur potentiel d'auto-oxydation rapide et de leur activité enzymatique élevée (Jayathilakan, 2012). Dans les pays développés, les sous-produits d'abattoir sont exploités dans la production d'aliments pour animaux, d'engrais et d'énergie (Walsh, 2014). Le Maroc et la Tunisie ont aussi réalisé des projets de valorisation locale des sous-produits d'abattoir pour produire du biogaz (EREP 2009; ANME 2010).

En Algérie les sous-produits animaux ne sont pas valorisés mais éliminés (Ouahabi, 2016). Selon la loi n° 88-08 du 26 janvier 1988 relative aux activités de médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale, « la destruction des sous-produits animaux doit être assurée par enfouissement, incinération ou procédé chimique autorisé et dans des conditions déterminées par voie réglementaire » (Journal officiel, 1988). Sur terrain, beaucoup de ces déchets sont jetés dans des décharges à ciel ouvert, ou bien vendus à des recycleurs du secteur informel qui les utilisent comme aliment pour animaux (Boucherba, 2015).

Introduction

Afin de contribuer à leur trouver un débouché, nous nous sommes intéressées à l'élaboration de nouveau milieux de culture à base de certains de ces sous-produits pour la production de bactéries lactiques notamment les lactobacilles.

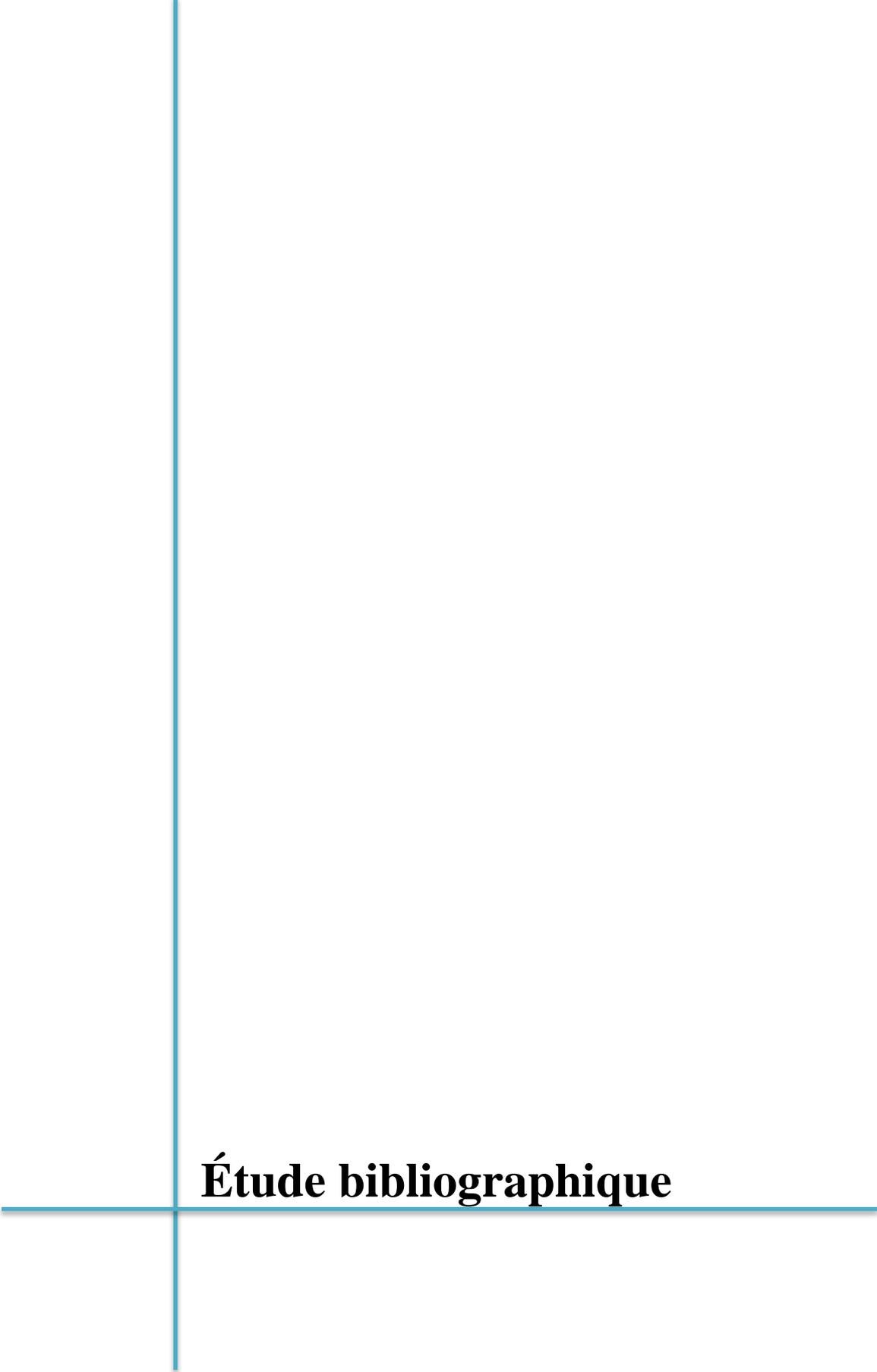
Ces dernières sont largement utilisées dans le domaine alimentaire, médical et pharmaceutique et leur production à grande échelle pose un problème de coût. En effet cette production nécessite des milieux de culture dont le plus utilisé pour les lactobacilles est le milieu MRS (de Mane, Rogosa et Sharpe).

Le coût élevé de ce milieu est essentiellement lié aux sources d'azote qui le composent et qui sont l'extrait de levure, l'extrait de viande et les peptones dérivés de la viande et de la caséine.

Pour réduire les coûts de production de ce milieu et par conséquent ceux des bactéries lactiques, nous avons substitué ces ingrédients coûteux par deux sous- produits d'abattoir : les intestins de poulets et les sabots de mouton. Cette voie nous semble prometteuse et intéressante à étudier vu la richesse de ces sous-produits en protéines et le manque de travaux bibliographiques concernant le sujet.

Cette étude pourrait avoir un double objectif :

- Le premier environnemental et il vise à réduire les quantités de sous- produits générés par la filière de la viande ne faisant l'objet d'aucune valorisation et pouvant être à l'origine de problèmes sanitaires et de pollution.
- Le second économique ayant pour but d'économiser des devises au pays en élaborant des milieux de culture peu coûteux à partir de déchets encombrants et créer de nouveaux postes d'emploi.



Étude bibliographique

1. Définition

Les sous-produits animaux sont des carcasses d'animaux, des parties de carcasses ou des produits d'origine animale qui ne sont pas destinés à la consommation humaine (Journal officiel de l'Union européenne, 2009).

Ils proviennent notamment de l'industrie agroalimentaire, des abattoirs, des boucheries (Doublie, 2010), ils recouvrent aussi les matières qui sont écartées de l'alimentation humaine en raison des habitudes alimentaires et des exigences élevées quant à la qualité des produits carnés (Perler et Bruhn, 2004).

2. Classification

Selon la réglementation de l'Union Européenne, les sous-produits sont catégorisés en trois catégories principales en fonction du risque sanitaire potentiel.

Ces règles de classification organisent la collection, le stockage, le transport, le traitement, l'utilisation ou l'élimination des sous-produits animaux (Juste, 2010).

2.1. Catégorie 1

Elle regroupe les sous-produits présentant un risque important pour la santé publique :

- Cadavres, corps ou parties de cadavres ou de corps issus d'animaux atteints ou suspects d'être atteints d'encéphalopathies spongiformes transmissibles.
- Matériels à risque spécifiés : MRS (qui présente un risque au regard des encéphalopathies spongiformes transmissibles).
- Carcasses et parties de carcasse contenant des MRS.
- Cadavres ou parties de cadavres qui, au moment de leur élimination finale, contiennent des MRS.
- Certaines matières organiques collectées des eaux résiduaires issues des établissements retirant des MRS.
- Viandes et autres produits d'origine animale contenant des substances interdites ou réglementées.

2.2.Catégorie 2

Elle comporte les matières présentant un risque moins important pour la santé publique :

- Cadavres d'animaux.
- Saisies et retraits pour motifs sanitaires.
- Matières contenant des résidus de médicaments vétérinaires.
- Matières issues des eaux résiduaires d'abattoir.
- Lisier et contenu de l'appareil digestif.
- Cas particulier des fœtus en abattoir.
- Mélanges de sous-produits animaux de catégories 2 et 3.
- Sous-produits animaux autres que les matières de catégorie 1 et 3.

2.3.Catégorie 3

Les sous-produits de catégorie 3 ne présentent aucun risque sanitaire, ce sont :

- Les produits propres à la consommation humaine déclassés en sous-produits animaux mais qui ne sont pas destinés à être utilisés comme denrées alimentaires.
- Le sang, le placenta, les peaux, les cornes, les soies, les plumes, les fourrures et les poils d'animaux qui ne présentent pas de signes d'une maladie transmissible à l'homme ou aux animaux.
- Les sous-produits animaux dérivés de la fabrication de produits destinés à la consommation humaine (MAAF, 2017).

L'importance de la classification des sous-produits d'abattoir se traduit par le fait que la catégorie:

- Définit le devenir du sous-produit (mode d'élimination, utilisation...).
- Définit les précautions prises lors du transport, de l'entreposage et de la manipulation.
- Aide à la séparation des sous-produits sur le site où ils sont produits pour éviter qu'il y ait un mélange des différentes catégories et, par conséquent, l'augmentation du risque.

3. Devenir des sous-produits animaux

Le devenir des sous-produits animaux diffère selon la catégorie à laquelle ils appartiennent :

3.1.Catégorie 01

Ces matières doivent être collectées par des opérateurs agréés qui les transforment en farine de viande et d'os et en graisses fondues de catégorie 1.

Ces produits dérivés sont soit incinérés, ou bien utilisés dans la fabrication de biodiesel en usines agréées.

3.2.Catégorie 02

Les sous-produits de catégorie 2 sont transformés en farine et en graisses animales (Perler et Bruhn, 2004), puis, ceux-ci sont incinérés ou bien utilisés sous conditions pour :

- La transformation oléo-chimique (pour les dérivés lipidiques)
- Utilisation dans une usine de production de biogaz ou de compostage.
- L'utilisation à des fins de diagnostic, d'éducation et de recherche sous autorisation.
- L'alimentation d'animaux non destinés à l'alimentation humaine (animaux de zoo, de cirques, animaux sauvages, reptiles...).

3.3.Catégorie 03

Les sous-produits de catégorie 3 peuvent être :

- Incinérés.
- Utilisés pour la production d'aliments pour animaux familiers.
- Utilisés dans des applications techniques.
- Utilisés pour la production de biogaz ou compostage.
- Utilisés à des fins de diagnostic, d'éducation et de recherche sous autorisation (Berthomet, 2007).

4. Modes d'élimination des sous-produits animaux

4.1. Incinération

Avant incinération, les sous-produits animaux doivent être entreposés dans des récipients fermés, ils sont souvent incinérés dans des fours rotatifs ou des incinérateurs à lit fluidisé. Pour assurer une combustion totale, le temps de séjour dans le four doit être suffisamment long (CE, 2005). La construction d'une installation d'incinération, son équipement ainsi que son exploitation doivent assurer la non propagation d'agents pathogènes (OESPA, 2011).

4.2. Enfouissement

L'enfouissement des cadavres d'animaux doit être étudié pour éviter toute contamination des eaux souterraines et de surface (Mounirattinam et Bernatchez, 2011). Les cadavres d'animaux enfouis doivent se trouver à 2 m au moins au-dessus du niveau de la nappe phréatique et être recouverts d'une couche de terre d'au moins 1,2 m (OESPA, 2011).

4.3. Compostage

C'est une décomposition biologique contrôlée qui consiste à transformer naturellement les sous-produits en compost, ce qui permet leur stabilisation. Le compostage se fait dans des conditions aérobies et la chaleur est produite biologiquement (CE, 2005).

Le produit final est riche en substances humiques et peut être épandu au bénéfice du sol (DEFRA, 2011).

Le compostage des sous-produits animaux peut être appliqué aux:

- Sous-produits d'abattoir tels que la litière de stabulation, le fumier, les contenus d'estomacs, les contenus d'intestins, le sang et les plumes.
- Sous-produit issu du traitement des eaux usées.
- Résidus solides issus de la production de biogaz (Nouad, 2011).

4.4. Fonte

C'est une transformation de certains sous-produits tels que les muscles, le gras, les os et les autres tissus animaux en une substance riche en protéines. Cette dernière est donc plus salubre, moins désagréable, et peut être entreposée pendant de longues périodes (Haines, 2004).

5. Voies de valorisation

5.1. Production de biogaz

C'est une digestion enzymatique assurée par des micro-organismes anaérobies qui utilisent les matières organiques biodégradables comme substrat pour produire du biogaz (Derbal, 2000). Ce dernier est un gaz combustible qui se compose d'un mélange de gaz carbonique et de méthane (Afilal, 2010).

Le digestat solide obtenu est séché pour faire l'objet:

- D'un compostage
- D'une incinération
- D'une utilisation comme engrais organiques ou amendements

Le biogaz peut être utilisé pour la production de chaleur, d'électricité ou de carburant (Foret, 2011).

5.2. Production d'engrais

Un engrais à base de sous-produits animaux peut comprendre le lisier, le guano non minéralisé, le contenu de l'appareil digestif, le compost et les résidus de digestion (Journal officiel de l'Union européenne, 2009).

Les matières de catégorie 3 destinées à la production d'engrais doivent être stérilisées sous pression avant la transformation en engrais (OESPA, 2011). Ce dernier est utilisé pour améliorer la nutrition des plantes et préserver les propriétés physico-chimiques des sols ainsi que leur activité biologique (Swillens, 2011).

5.3. Alimentation humaine

Les carcasses d'animaux déclarés propres à la consommation humaine peuvent être valorisées pour la production de produits à base de viande :

- Les os de bovin dégraissés (après consommation de la chair) sont traités pour produire de la gélatine alimentaire (CNA, 2011).
- Le gras animal peut être destiné à la consommation humaine après transformation, c'est le cas du saindoux, la graisse de fonte de bovin et le gras de canard qui sont incorporés dans la charcuterie, la salaison, les plats cuisinés et la biscuiterie (Halewym et Chevalier, 2007).

5.4. Alimentation animale

Après traitement, les sous-produits animaux peuvent être exploités en alimentation animale, ils sont utilisés sous forme de :

5.4.1. Farines animales

C'est la voie la plus courante de transformation des sous-produits animaux utilisée pour l'affouragement des animaux de rente (Foret, 2011). Mais en 1990, et suite à l'identification du prion comme agent pathogène et la suspicion de son implication dans le développement de l'encéphalopathie spongiforme bovine, la production de farine animale a été restreinte, puis interdite pour l'affouragement de tous les animaux de rente (Coutand, 2007 ; Perler et Bruhn, 2004).

Il existe une grande variété de farines animales:

5.4.1.1. Farines de viande : ce sont des farines typiques de viande issues de rejets provenant d'abattoirs ou de l'équarrissage.

5.4.1.2. Farines d'os et leurs dérivés : les os peuvent être employés pour fabriquer des farines et des poudres riches en phosphore; elles sont utilisées comme suppléments dans certains aliments.

5.4.1.3. Farines de sang et leurs dérivés : Le sang entier, le plasma sanguin et les cellules sanguines qui proviennent des abattoirs revêtent une importance particulière dans l'alimentation des porcelets après transformation en farines.

5.4.1.4. Farines de volailles et de plumes: produites lors de la transformation à partir des os, des muscles, des viscères et des plumes (Halewym et Chevalier, 2007).

5.4.2. Graisse

Les graisses animales des volailles et des porcs trouvent débouchés dans l'oléochimie la savonnerie, l'alimentation des porcs (Girard, 2008) et des animaux de rente (Lapierre, 2010).

5.4.3. Pet Food (pour l'alimentation des animaux de compagnie)

Il peut être produit à partir des sous-produits de porcs, de volailles et de ruminants qui font l'objet d'un traitement pour obtenir un substrat protéique et une graisse intégrés dans les aliments secs pour chiens et chats (Foret, 2011 ; CNA, 2011).

5.5. Fabrication de produits à haute valeur ajoutée

5.5.1. Le collagène

C'est une protéine de structure de la peau et du squelette des animaux (Randriamahatody, 2011), il est utilisé en cosmétique, en industrie alimentaire et en médecine (Zuber *et al.*, 2015) notamment pour la substitution et la régénération des tissus (Coelho *et al.*, 2017). Il est produit selon un procédé qui consiste généralement à un lavage et une adaptation du pH au moyen d'un acide ou d'une base, il est ensuite rincé, filtré, extrudé et soumis à un procédé de dessiccation (OESPA, 2011). Le collagène est généralement produit à base de protéines dérivées des peaux, des cuirs, des os et des tendons des animaux (Journal officiel de l'Union européenne, 2009).

5.5.2. La colle

C'est l'une des principales applications techniques des gélatines (Babel *et al.*, 2000). La colle animale est une protéine dérivée de l'hydrolyse chimique du collagène, elle peut être obtenue à partir de l'os en conditions douces par alcalinisation et extraction à 60 °C, après filtration, la phase aqueuse est concentrée sous vide (Malepeyre *et al.*, 2010).

5.5.3. Les protéines hydrolysées

Ce sont les polypeptides, peptides et acides aminés, y compris les mélanges de ces substances, obtenus par l'hydrolyse des sous-produits animaux (OESPA, 2011); c'est le cas de la production d'acides aminés à partir de plumes qui consiste à hydrolyser la kératine ce qui permet d'obtenir trois produits :

- La cystine (principe actif de l'industrie pharmaceutique),
- La tyrosine (principe actif utilisé dans la nutrition infantile et sportive),
- La kéramine (solution d'acides aminés) (Nouad, 2011).

6. Problèmes liés aux sous-produits animaux

Les sous- produits animaux ont des effets négatifs sur la santé humaine, animale et sur l'environnement. Ces effets sont dûs généralement à leur nature putrescible et aux germes pathogènes qu'ils peuvent contenir. Le risque est essentiellement lié au retard ou à l'absence d'une bonne gestion de ces sous-produits.

6.1. Effets sur l'homme

Les sous-produits animaux peuvent contenir des agents pathogènes relativement dangereux pour la santé humaine (Cointreau, 2006). Durant le procédé de compostage, une large variété de microorganismes pathogènes et de composés chimiques contenus dans la matière brute ou dans le compost constituent des dangers qui peuvent être d'ordre toxique, irritatif, inflammatoire, mutagène voire cancérigène (FNAD 2002).

L'odeur constitue un autre problème, elle résulte de la décomposition des sous-produits animaux au cours de leur stockage et leur transformation, elle est aussi produite au cours de la production des farines et provient même des eaux usées issues du traitement des sous-produits (Nouad, 2011 ; CE, 2005).

6.2. Effets sur l'environnement

Les installations de traitement des sous-produits animaux rejettent dans l'eau des liquides à forte teneur organique (CE, 2005), ceux-ci sont des vecteurs d'insectes, de vermine, de bactéries et de virus qui peuvent entraîner une contamination de l'eau et une pollution de l'air (FAO, 2011). Les incinérateurs aussi émettent dans l'air des produits gazeux posant des problèmes de pollution (Nouad, 2011).

7. Les sous-produits avicoles

L'industrie de poulet génère d'énormes quantités de sous-produits dans le monde entier (Lasekan *et al.*, 2012). Ces sous-produits comprennent les abats, les os, le sang, les viscères, les pieds et les plumes; mais dans certaines régions du monde, certains d'entre eux peuvent être considérés comme aliments. Dans les pays développés ; les cous, les pieds et les intestins riches en protéines sont utilisés comme fumier ou engrais (Sams *et al.*, 2001), ils sont aussi valorisés en aliments pour animaux domestiques ou comme source alternative de protéines pour l'alimentation du porc (Kannan *et al.*, 2008).

Les plumes sont utilisées comme matériau de literie et de décoration et dans la production de farine, de fumier et d'engrais (Sams *et al.*, 2001). Elles peuvent aussi être valorisées par des microorganismes dotés d'activité kéranolytique qui les convertissent en lysat de plume, ce dernier est riche en protéines digestibles pouvant servir dans l'alimentation animale (Bohacz, 2017).

Chapitre I : Les sous-produits animaux

Les intestins qui constituent un des sous-produits de poulet les plus abondants, posent aussi un grand problème d'élimination (Raju *et al.*, 1997). Des voies d'utilisation ont été relatées dans la littérature, en effet, Mane *et al.*, (2010) ont rapporté que les intestins de poulet constituaient une bonne source d'enzymes protéolytiques facilement séparées par extraction aqueuse (Damle *et al.*, 2010), ce qui encourage l'utilisation de ces enzymes dans des processus d'hydrolyse. (Raju *et al.*, 1997). Tabinda *et al.*, (2012) ont pu remplacer la chair de poisson par les intestins de poulet dans la formulation d'aliments pour poisson.

Des recherches ont également porté sur l'exploitation des sous-produits de poulet pour la production de produits fonctionnels (tableau 1).

En Algérie, l'aviculture constitue un secteur en plein essor et la production de poulet connaît la plus grande croissance par rapport à n'importe quelle exploitation animale. Cette industrie génère de grandes quantités de sous-produits, mais ceux-ci ne font l'objet d'aucune valorisation (Nouad, 2011).

Tableau 1: Propriétés fonctionnelles et bioactives des hydrolysats des différents sous-produits de poulet (Lasekan *et al.*, 2012)

Hydrolysats du sous-produit	Propriétés fonctionnelles et bioactives	Références
Os du pied de poulet	Inhibiteur d'E.C.A	Cheng <i>et al.</i> , (2009 a,b) Saiga <i>et al.</i> , (2008) et Nakade <i>et al.</i> , (2008)
Viscères	Milieu de culture pour <i>E. coli</i> et émulsifiant Antioxydant et inhibiteur d'E.C.A	Jamdar et Harikumar (2008 a,b) Jamdar <i>et al.</i> , (2012)
Plumes hydrolysées par hydrolyse acide	Inhibiteur d'E.C.A	Karamac <i>et al.</i> , (2005)
Farine de plumes et plumes brutes	Antioxydant	Ohba <i>et al.</i> , (2003) et Fakhfakh <i>et al.</i> , (2011)
Sang de poulet	Inhibiteur d'E.C.A	Huang et Liu (2010)

8. Les sous-produits ovins

La production ovine génère d'énormes quantités de sous-produits, soit 48 % de chaque mouton (Labioui *et al.*, 2007). La liste des sous-produits ovins diffère d'une région à une autre du fait des traditions, en Algérie, ils sont constitués essentiellement de sang, d'os, de cornes et de sabots, ces derniers occupent une bonne partie des déchets ovins et sont connus pour être riche en protéines.

Dans les pays développés, les sabots peuvent être transformés en farine utilisée comme une source précieuse de protéines dans les aliments pour animaux de compagnie et comme engrais biologique (Ouane et Santra, 2004). La kératine extraite de sabots est une bioressource exploitée dans le domaine du cosmétique et du bio médical. (Rouse et Dyke, 2010 ; Kakkar *et al.*, 2014).

En Algérie, ce sous-produit n'est pas valorisé, il suit les voies d'élimination comme tout autre sous-produit animal générant ainsi des problèmes de santé et de pollution.

1. Définition et caractéristiques générales

Le terme «bactéries lactiques » décrit un groupe de microorganismes gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Ce groupe est assez hétérogène (Dortu, 2008) et ses genres présentent des variations dans les caractéristiques à l'exception de deux caractères principaux qui ne peuvent pas être contestés : le gram-positif et la non-sporulation. En général, les bactéries lactiques sont des microorganismes asporulées, non mobiles, oxydase négative et anaérobies facultatives : microaérophiles (Khalisanni, 2011). Ces bactéries sont non pigmentées, catalase négative à l'exception de certains genres à pseudocatalase, tolérant des pH acides, généralement mésophiles (Dortu, 2008) mais largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes (Bornert, 2000).

2. Biotope

Le sol, les plantes et, plus tard, l'intestin des animaux herbivores, sont considérés comme premières niches hypothétiques des bactéries lactiques ancêtres (Morelli *et al.*, 2012) avant la transition au tractus gastro-intestinal des mammifères ainsi que l'appareil génital de la femme (Björkroth et Holzapfel, 2006; Ruiz *et al.*, 2009). Ces bactéries sont ubiquistes et capables de survivre dans des milieux très acides (Ikeda *et al.*, 2013) en raison de leur production d'acide lactique (Gálvez *et al.*, 2011). Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées, (Baliarda, 2003) et se trouvent dans divers produits alimentaires : le lait et ses dérivés (beurre, fromage, yaourts), les viandes (saucisses, saucissons), les boissons (vin, cidre, bière), le pain ou les produits végétaux (chou, soja, manioc) (Adams et Marteau, 1995; Axelsson, 2004).

De nombreux travaux ont démontré aussi la présence des bactéries lactiques dans les tractus digestifs de différentes espèces de poissons et ont suggéré que l'intestin de poissons pouvait être un réservoir normal pour les bactéries lactiques. D'autres habitats marins peuvent être les autres animaux marins, les sédiments, et l'eau (Ringo, 2004).

3. Taxonomie

La classification des bactéries lactiques est en grande partie basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit, la capacité de se développer aux concentrations élevées en sel, la tolérance des conditions acide ou alcaline, et la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire (Axelsson, 2004).

La taxonomie actuelle se base sur de nouvelles technologies telles que la PCR et le séquençage direct du gène de l'ARNr 16S qui permettent une détermination plus facile des genres lactiques. Suite à l'utilisation de ces nouvelles technologies, la classification taxonomique a considérablement changé, des espèces ont été identifiées comme un nouveau genre, d'autres ont été fusionnées en une seule espèce (Pot, 2008).

Selon la classification actuelle, les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales* (Quinto *et al.*, 2014). D'après les dernières révisions taxonomiques, ce groupe comporte les genres suivants: *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*, *Agitococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Jeotgalibaca*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus*, *Trichococcus*, *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Sharpea*, *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Anthococcus*, *Lactococcus*, *Okadaella*, *Streptococcus*, *Aerosphaera*, *Carnococcus* et *Chungangia* (NCBI Taxonomy browser).

Parmi tous ces genres, certains revêtent une très grande importance technologique à savoir : le genre *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* et *Lactococcus*.

Le genre *Bifidobacterium* est souvent lié aux bactéries lactiques car il partage certaines de leurs caractéristiques typiques, mais il est phylogénétiquement non lié (Axelsson, 2004).

3.1. Description du genre *Lactobacillus*

C'est le plus grand genre de bactéries lactiques, il englobe actuellement environ 280 espèces de différentes origines (NCBI Taxonomy browser) présentant une grande variété de propriétés phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Cette hétérogénéité et ce grand nombre d'espèces sont dus à la définition du genre qui regroupe essentiellement des bactéries lactiques de forme bacillaire.

Ce sont des bactéries à gram positif, non sporulés, bacilles ou cocobacilles avec un pourcentage de G+C généralement inférieur à 50. Ce groupe de bactéries est fastidieux et se trouvent dans des milieux riches en glucides.

Chapitre II : Les bactéries lactiques

Actuellement, les lactobacilles sont divisés en 3 groupes selon leurs caractéristiques fermentaires le groupe I anciennement appelé « *Thermobacterium* », le groupe II anciennement appelé « *Streptobacterium* » et le groupe III anciennement appelé « *Betabacterium* » (Larpen, 2000). Les caractéristiques utilisées pour distinguer ces trois groupes ainsi que les espèces les plus connues de chaque groupe sont montrés dans le tableau 2.

Tableau 2: Organisation du genre *Lactobacillus* (Axellsson, 2004)

Caractéristiques	Groupe I Homofermentaires obligatoires	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires obligatoires
Fermentation de pentose	–	+	–
CO ₂ à partir du glucose	–	–	+
CO ₂ à partir du gluconate	–	+ ^a	+ ^a
Présence de Fructose-1,6- diphosphate aldolase	+	+	–
Présence de Phosphocétolase	–	+ ^b	+
Espèces type	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruekii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

a: quand il est fermenté

b : induit par les pentoses

4. Métabolisme des bactéries lactiques

4.1. Métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques montrent un métabolisme relativement simple où le sucre est converti principalement en acide lactique (Kleerebezemab *et al.*, 2000), par des voies homo- ou hétérofermentaires.

Les sucres entrent dans les voies principales de la glycolyse après isomérisation et/ou phosphorylation. La voie homofermentaire entraîne la transformation du glucose en pyruvate par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (glycolyse), produisant éventuellement de l'acide lactique, théoriquement, ces bactéries produisent deux molécules d'acide lactique à partir d'une molécule de glucose.

Contrairement aux homofermentaires, les hétéro-fermentaires (exemples de *Oenococcus oeni*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fructivorans* et *Lb. kunkeei*) manquent d'aldolase et doivent détourner le flux de carbone à travers une différente série de réactions, qui est la voie des pentoses phosphate ou la phosphoketolase (Kenneth *et al.*, 2006).

4.2. Métabolisme de l'azote

Il est connu que les bactéries lactiques ont une capacité très limitée à synthétiser des acides aminés en utilisant des sources d'azote inorganiques. Ils dépendent donc des acides aminés présents dans le milieu de croissance comme source d'azote.

La croissance des bactéries lactiques sur les milieux minimaux chimiquement définis est généralement lente, et il est clair que ces bactéries se sont adaptées à des environnements riches en développant des systèmes pour exploiter efficacement les sources d'azote présentes : le système protéolytique (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont capables de répondre aux changements de la disponibilité de l'azote en régulant l'activité du système protéolytique afin d'assurer l'équilibre d'azote dans la cellule. Il a été constaté que la synthèse de nombreuses exo-protéines est influencée, en partie, par les niveaux de nutriments dans l'environnement extracellulaire (de Nadra, 2007).

4.3. Métabolisme du citrate

Le citrate est présent dans de nombreux substrats utilisés pour les fermentations alimentaires tels que les fruits, les légumes et le lait et il peut être fermenté par un nombre

limité de bactéries lactiques. La présence d'une citrate perméase est essentielle pour le métabolisme du citrate, celui-ci est converti initialement en oxaloacétate et acétate par la lyase (Hugenholtz, 1993). L'étape suivante dépend de la présence ou de l'absence de l'enzyme oxaloacétate décarboxylase. Si elle est présente, l'utilisation du citrate entraîne une augmentation du stock de pyruvate, ce qui peut conduire à un motif de produit final altéré, (par exemple, la production d'acétone). Si l'oxaloacétate décarboxylase est absente, une autre voie est suivie : la voie acide succinique (Axelsson, 2004).

La fermentation du citrate par les bactéries lactiques mène à la production de composés, principalement à propriétés aromatiques. Parmi ces composés, le diacétyl est responsable de l'arôme de beurre des produits laitiers tels que le beurre, le fromage de crème et le fromage blanc acide. En outre, le CO₂ produit du métabolisme du citrate contribue à la formation des « yeux » (des trous) de quelques types de fromages (Quintans, 2008).

5. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

De façon générale, les exigences nutritionnelles d'un microorganisme sont divisés en éléments essentiels dont l'effet est vital, des d'éléments stimulateurs, qui favorisent la croissance et dont l'absence cause une baisse du taux de croissance, et des éléments non essentiels, qui n'ont aucun effet sur la croissance (Hayek et Ibrahim 2013). Quant aux bactéries lactiques, elles sont connues pour être des micro-organismes fastidieux (de Nadra, 2007) dont la plupart exigent à la fois des carbohydrates, des acides aminés, des peptides, et des vitamines (Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010).

On peut résumer les besoins nutritionnels des bactéries lactiques dans les points suivants :

5.1. Exigences en source de carbone

Les bactéries lactiques peuvent utiliser la plupart des sucres comme sources de carbone et d'énergie, mais le glucose est généralement préféré par un grand nombre de souches lactiques (Kim *et al.*, 2009). Cependant, le carbone et l'énergie peuvent être tirés aussi de l'extrait de levure, de l'extrait de peptone, des acides aminés et du glycérol (Hayek et Ibrahim, 2013)

5.2. Exigences en azote

Les bactéries lactiques exigent un apport en acides aminés et en peptides pour répondre à leurs besoins en azote complexe. La dépendance des bactéries lactiques en acides aminés à

partir de sources d'azote organiques est due à leur capacité très limitée de synthèse des acides aminés à partir de l'azote inorganique (Wright et Axelsson, 2011).

Les exigences en acides aminés des bactéries lactiques varient selon l'espèce, par exemple, *Lb. plantarum* exige seulement 3 acides aminés, tandis que *Lb. acidophilus* exigent 14 acides aminés (Barrangou *et al.*, 2011). Cette exigence diffère aussi au sein des souches de la même espèce, par exemple, certaines souches de *Lc. Lactis subsp. lactis* sont prototrophes pour la plupart des acides aminés, tandis que *Lc. Lactis subsp. cremoris* nécessite 13 à 15 acides aminés (Chopin, 1993).

5.3. Besoins en minéraux

Les bactéries lactiques ont besoin des minéraux en tant que facteurs essentiels ou stimulateurs pour le transport nutritif et l'activité enzymatique. Ainsi, les ions métalliques jouent un rôle important dans la croissance et l'activité métabolique de ces bactéries lactiques (Hayek et Ibrahim, 2013). Les minéraux nécessaires pour les bactéries lactiques, sont généralement le fer, le manganèse, le magnésium, le calcium, le potassium, le sodium (Leveau et Bouix, 1993), mais ces besoins diffèrent d'une espèce à une autre (Robert *et al.*, 1947).

5.4. Besoins en vitamines

Les bactéries lactiques ne peuvent pas synthétiser plusieurs vitamines (Marth et Steele, 2001). Cependant, certaines souches ont la capacité de synthétiser des vitamines hydrosolubles comme celles inclus dans le groupe B (folates, riboflavine et vitamine B12 notamment) (LeBlanc *et al.*, 2010).

Le manque d'une vitamine exigée par une souche lactique provoque une diminution plus ou moins importante de sa croissance (Hayek et Ibrahim, 2013).

6. Rôles des bactéries lactiques

6.1. Utilisation des bactéries lactiques en alimentation humaine et animale

Les bactéries lactiques jouent un rôle très important dans l'industrie alimentaire ; ceci a été rapporté par plusieurs travaux qui illustrent leur utilisation dans la production et la préservation des produits alimentaires (Moshood et Tengku Haziyaamin 2013).

Les bactéries lactiques sont très employées dans l'industrie alimentaire en raison de leurs rôles dans la fermentation des aliments (fruits, légumes, viandes, lait ...etc.). Elles améliorent leur valeur nutritionnelle et leur digestibilité (Hasan *et al.*, 2014). En plus, elles développent les propriétés organoleptiques des aliments. Ceci est dû à l'action des enzymes glycolytiques, lipolytiques et protéolytiques, ces enzymes qui transforment les nutriments en composés ayant des propriétés sensorielles, et qui, à la fin, modifient la structure et l'arôme de l'aliment fermenté (Todorov *et al.*, 2012).

Elles sont aussi exploitées pour leur activité préservative dans quelques aliments. Elles peuvent empêcher ou réduire la contamination par les micro-organismes d'altération et/ou pathogènes en produisant divers composés antimicrobiens (Martinez *et al.*, 2013). L'acidification des aliments par la production d'acides organiques, principalement l'acide lactique inhibe aussi la croissance des micro-organismes indésirables et mène à l'augmentation de la durée de conservation du produit fermenté en comparaison avec celui non-fermenté (Leroy et De Vuyst, 2004).

6.1.1. Les bactéries lactiques et les produits laitiers

Les bactéries lactiques ont été utilisées depuis l'antiquité dans la production des produits laitiers sans savoir l'existence de ces micro-organismes. Plus tard, des ferments lactiques ont été sélectionnés et définis avec des propriétés bien choisies pour donner des produits laitiers standards.

Elles sont employées comme ferments pour fermenter le lactose pendant la production de fromage (celles-ci sont mésophiles ou thermophiles), d'autres sont impliqués pour la maturation du fromage (*Lb. casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*...) (Fondén *et al.*, 2003).

6.1.2. Les bactéries lactiques et les produits carnés

L'utilisation des bactéries lactiques du en tant que ferments bio-protecteurs améliore la stabilité et la sûreté microbiennes dans la conservation commerciale de viande (Castellano *et al.*, 2008). Dans les saucisses, les bactéries lactiques convertissent les sucres fermentescibles dans en acide lactique, ce qui contribue à la sécurité du produit en créant des conditions défavorables aux microorganismes pathogènes et ceux d'altération.

La production de l'acide lactique a également un impact direct sur la qualité sensorielle du produit en fournissant un goût acide doux, et en soutenant le processus de séchage qui exige un la baisse du pH (Kröckel, 2013).

6.1.3. Les bactéries lactiques et les produits végétaux

Lors de la fermentation naturelle des légumes, des bactéries lactiques hétéro- et homo fermentatives qui s'y trouvent de façon spontanée se succèdent pour assurer ce processus avec ou sans l'action des levures (Tamminen *et al.*, 2004). L'utilisation des *Lactobacillus* comme ferments pour les produits végétaux mène à une acidification accélérée par rapport aux fermentations spontanées (Dorrit *et al.*, 2013), et à une amélioration de la qualité sensorielle (Aponte *et al.*, 2012).

6.1.4. Les bactéries lactiques et les produits de panification

Les lactobacilles hétérofermentaires jouent un rôle très important dans la fabrication du pain, et l'acide acétique formé lors de la fermentation hétérolactique est essentiel pour la saveur du pain et la durée de sa conservation (Salovaara, 2004). Dans le pain sans gluten, une souche de *Lactobacillus reuteri* a montré un grand potentiel bio-préservateur, son ajout a mené à une amélioration de la valeur nutritive et de la qualité du produit (Axel *et al.*, 2015).

6.1.5. Les bactéries lactiques dans la vinification

La vinification est un processus complexe dans lequel les bactéries lactiques jouent un rôle significatif (La Hens *et al.*, 2015). *Lb. plantarum* est l'espèce la plus impliquée dans les processus de vinification (Ferrada *et al.*, 2013).

6.2. Bactéries lactiques dans le domaine de la santé

Des souches de bactéries lactiques dites «probiotiques», présentent des propriétés bénéfiques pour la santé, ce sont des microorganismes ingérées vivants et capables d'exercer des effets physiologiques sur leur hôte (Fuller, 1989).

Vu leur intérêts, elles peuvent être impliquées dans la production d'aliments fonctionnels spécifiques (Mozzi *et al.*, 2010). Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits.

6.2.1. Stimulation du système immunitaire par les bactéries lactiques

Des souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacteria* et leurs produits fermentés ont été rapportés comme étant efficaces pour améliorer l'immunité innée et adaptative (Galdeano et

Perdigón 2006). Des études *in vitro* ont prouvé que plusieurs souches de bactéries lactiques favorisent la capacité d'immuno potentialisateur des cellules du système immunitaire inné, y compris les macrophages, les NK (Natural killer) (Kato *et al.*, 1983). et les lymphocytes (Perdigón *et al.*, 1986).

6.2.2. Modulation de l'allergie

Plusieurs études ont prouvé que les bactéries lactiques jouent un rôle principal dans la modulation de l'allergie. Une étude comparative entre la flore microbienne intestinale d'enfants de 2 ans a révélé que ceux allergiques ont été moins souvent colonisés avec des lactobacilles et le bifidobacteria, par rapport aux enfants non-allergiques. Ainsi, Matsuzaki *et al.*, (1998) ont rapporté que l'alimentation orale d'une souche de *Lactobacillus casei* a effectivement empêché la production de l'immunoglobuline (Ig) E *in vivo* et *in vitro*.

6.2.3. Prévention de la diarrhée

La prévention de la diarrhée par les bactéries lactiques a été démontrée par quelques travaux (Fooks *et al.*, 1999) qui élucident un rôle efficace de certaines souches spécifiques dans les aliments laitiers probiotiques à soulager le malaise intestinal et d'empêcher la diarrhée des voyageurs, diarrhées à rotavirus, diarrhées associées aux antibiotiques, (Chermesh et Eliakim, 2006) et diarrhée associée à *Clostridium difficile* et la diarrhée induite par les rayonnements (Harish et Varghese, 2006).

6.2.4. Effet sur la digestion du lactose

La mal absorption du lactose est dû essentiellement à la déficience en β -galactosidase (Pundir *et al.*, 2013). La consommation des produits laitiers additionnés de ferments lactiques (*Lb. bulgaricus* et *Lc. Lactis*...) tels que le yaourt et le lait fermenté réduit ses symptômes (de Vrese *et al.*, 2001), et il a été suggéré que la lactase de ces microorganismes peut survivre et rester active dans le tractus intestinal, participant donc à l'hydrolyse du lactose (Savaiano, 2014).

6.2.5. Prévention de cancer

Les bactéries lactiques ont été associées à la prévention et le traitement des cancers, (Nandhini et Palaniswamy, 2013) et différents mécanismes leur sont attribués. Dans une autre étude (Choi, 2006) ont démontré que des polysaccharides solubles dérivés de *Lb. acidophilus* 606 exercent une activité antioxydante significative, aussi bien qu'une activité anticancéreuse sur une variété de cellules cancéreuses.

Wang (2012) a étudié les effets des lactobacilles sur le cancer du côlon et il a trouvé que les parois cellulaires de cinq souches de lactobacilles obtenues à partir d'aliments fermentés traditionnels ont une activité anticancéreuse significative. Capozzi *et al.*, (2012) ont montré que des souches de *Lb. plantarum* sont capables de dégrader les amines biogéniques dans le vin qui présentent un risque toxicologique pour la santé du consommateur.

6.2.6. Réduction du cholestérol

Beaucoup de chercheurs ont pu isoler et caractériser des souches lactiques probiotiques avec un bon potentiel de réduction du cholestérol. Tsai *et al.*, (2014), Huang *et al.*, (2013) et Wang *et al.*, (2012) leur suggèrent un bon rôle dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014).

Pereira et Gibson (2002) ont rapporté que la capacité à réduire le cholestérol des bactéries lactiques et de Bifidobacteria dépend fortement de sa capacité de croissance. De même, (Kumar *et al.*, 2012) ont étudié *in vitro* la relation entre la croissance de *Lb. casei* et la réduction du cholestérol en utilisant les plans statistiques d'optimisation, ils ont pu établir que la production de biomasse est accompagnée d'une réduction du cholestérol et ceci est influencé par les paramètres physiologiques : température, pH, et volume d'inoculum.

6.2.7. Effet sur la dermatite atopique

Des investigations ont rapporté un bon effet des lactobacilles dans le cas des dermatites atopiques, les résultats sont très encourageants et montrent que l'administration de certaines souches de *Lactobacillus* (Gromert et Axelsson, 2009; Woo *et al.*, 2010) ou bien des combinaisons de celles-ci (Rosenfeldt *et al.*, 2003; Wang et Wang, 2015) mènent à une amélioration clinique chez les enfants atteints d'eczéma.

6.2.8. Effet sur la vaginose bactérienne

La flore vaginale des femmes avec une vaginose bactérienne contient un nombre réduit de lactobacilles en comparaison avec des femmes en bonne santé.

Les diverses études *in vitro* ont prouvé que les souches spécifiques de lactobacilles empêchent la croissance des bactéries causant la vaginose en produisant de l' H_2O_2 , l'acide lactique, et/ou les bactériocines, et/ou empêchent l'adhérence de *Gardnerella vaginalis* à l'épithélium vaginal (Falagas *et al.*, 2007).

7. Étude de quelques espèces de lactobacilles

7.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis est une bactérie mésophile obligatoirement hétérofermentaire (Bourgeois et Larpent, 1996). Elle utilise la voie de la phosphocétolase, mais possède également des enzymes glycolytiques inductibles (Saier *et al.*, 1996). Elle se retrouve couramment dans les produits végétaux et les milieux riches tels que les boissons et les tractus intestinaux des animaux (Salminen et Wright, 1993).

Cette espèce est connue par sa capacité de produire des enzymes à intérêt technologique, par exemple, des souches de cette espèce ont été démontrés pour être productrices de glutamate décarboxylase qui catalyse l'alpha-décarboxylation irréversible du L-glutamate en acide gamma-aminobutyrique, ce dernier est un acide aminé non trouvé dans les protéines qui présente des effets hypotensifs et diurétiques chez les animaux (Hiraga *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2010).

Ainsi, Sümengen *et al.*, (2012) ont montré la capacité d'une souche de *Lb. brevis* isolée à partir du fromage à produire la phytase, celle-ci améliore la qualité nutritionnelle des aliments notamment ceux riches en phytate.

Lb. brevis contribue aussi dans les processus de fermentation; dans le pain, son association avec *Saccharomyces cerevisiae* mène à une amélioration de la production des composés aromatiques (Meignen *et al.*, 2001).

Dans le domaine de la santé, de nombreuses souches de *Lactobacillus brevis* ont montré un potentiel probiotique et leur administration réduit l'incidence de la grippe (Waki *et al.*, 2014) et peut prévenir l'infection à *Helicobacter pylori* (Linsalata *et al.*, 2004)

7.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum est l'une des espèces les plus répandues du genre lactobacille, c'est une bactérie hétérofermentaire facultative et acido-tolérante (Brinques *et al.*, 2010), elle fermente les hydrates de carbone généralement par la voie de phosphocétolase (PKP) (Sabo *et al.*, 2014). Elle ne possède pas de superoxyde dismutase (SOD) et est pourtant capable de dismuter le superoxyde par l'accumulation de Mn^{2+} (Leveau et Bouix, 1993).

Cette bactérie peut être rencontrée dans les produits laitiers et les nourritures fermentées : la choucroute, le levain, les saucisses, les fromages, les vins, et les olives

(Hammes et Vogel, 1995). Elle vit dans différents niches écologiques, et dans les appareils gastro-intestinaux humains et animaux (Siezen *et al.*, 2010). Son comportement flexible et adaptatif est reflété par le nombre relativement grand des fonctions de transport et de régulation, y compris 25 systèmes complets de phosphotransférase de sucre (Kleerebezem *et al.*, 2003).

Une large variété d'avantages liés à l'utilisation du *Lb. plantarum* en tant que probiotique a été rapportée en littérature (Zago *et al.*, 2011 ; Ningegowda et Gurudutt, 2012). Certaines souches probiotiques de *Lb. plantarum* ont été employées pour le développement d'aliments fonctionnels et de vaccins oraux potentiels (Parente *et al.*, 2010). Selon Gallego *et al.*, (2011) l'administration d'une souche probiotique de *Lb. plantarum* aux personnes âgées peut améliorer leur état général de santé. *Lb. plantarum* peut aussi accroître la fonction de barrière intestinale par inhibition de quelques bactéries pathogènes et peut maintenir l'équilibre de la flore intestinale (Anderson *et al.*, 2010; Ducrotté, *et al.*, 2012).

Du point de vue technologique, *Lb. plantarum* est un microorganisme industriellement important (Sabo *et al.*, 2014). Plusieurs substances produites par les souches de *Lb. plantarum* peuvent contribuer à l'amélioration des caractéristiques organoleptiques (Todorov, 2009). *elle* est aussi l'une des bactéries lactiques les plus importantes utilisées dans la fermentation d'olives (Sabatini *et al.*, 2008 ; Corsetti *et al.*, 2012), parce qu'elle a la capacité d'améliorer le rendement d'acide lactique, de contrôler le processus microbiologique durant la fermentation des olives verts et d'améliorer les caractéristiques organoleptiques du produit final (Panagou *et al.*, 2008 ; Ruiz-Barba *et al.*, 2010 ; Hurtado *et al.*, 2012).

Des souches de *Lb. plantarum* sont commercialement employées pour leur capacité de produire les bactériocines qui peuvent empêcher la croissance de quelques bactéries pathogènes et d'autres qui peuvent altérer les aliments : la biopreservation (Muller *et al.*, 2009). Ses propriétés antimicrobiennes sont dues à la production de composés antimicrobiens tels que des bactériocines, les bacteriocine-Like, l'acide phenyllactique, les acides organiques (acide principalement lactique et acétique) et le peroxyde d'hydrogène (Todorov *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2012).

7.3. *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus, connu précédemment comme *Lb. casei subsp. rhamnosus*, est une bactérie hétérofermentaire facultative, de forme bacillaire, isolée ou regroupée en courtes chaînes. Elle peut croître à 15°C et à 45° et fermente les glucides tels que l'arabinose, le cellobiose, l'esculine, le ribose, le sorbitol, et le sucrose (Fuquay *et al.*, 2011).

La souche de *Lb. rhamnosus* ATCC 53013 a été impliquée dans le traitement et réduction du risque de diarrhée par rotavirus, la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques, le traitement de la diarrhée récurrente de *C. difficile*, l'allègement de l'eczéma atopique chez les nourrissons, la prévention des maladies atopiques, la réduction des symptômes de la fibrose kystique et l'amélioration du microbiote des bifidobactéries (Fonden *et al.*, 2000 ; De Roos et Katan, 2000 ; Isolauri *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2003).

Verdenelli *et al.*, (2009) ont étudié la souche de *Lb. rhamnosus* isolée à partir de fèces humains *in vitro* et *in vivo* et ils ont rapporté qu'elle est potentiellement probiotique et qu'elle pourrait être utilisée pour promouvoir la santé.

7.4. *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum est une bactérie thermophile hétérofermentaire qui peut se développer à 45°C. La souche type est ATCC 14931, les souches de *Lb. fermentum* isolées ou en paires sous forme de bacilles sont très variables dans la longueur. Cette bactérie utilise différents glucides : arabinose, cellobiose, galactose, maltose, mannose, melibiose, raffinose, ribose sucrose, tréhalose et xylose (Fuquay *et al.*, 2011).

Bien que *Lb. fermentum* soit utilisé dans la fermentation des produits alimentaires notamment celle du fromage (Hui *et al.*, 2004) et du lait fermenté (zabady) (Bernardeau *et al.*, 2006), des applications dans le domaine santé sont plus intéressantes et beaucoup plus étudiées. En effet, *Lb. fermentum* est une espèce connue d'être potentiellement probiotique (Mikelsaar et Zilmer, 2009). Elle peut atténuer l'effet pro-inflammatoire de *Yersinia enterocolitica* sur les cellules épithéliales humaines (Frick *et al.*, 2006). L'apport oral de la souche *Lb. fermentum* CECT5716 améliore la réponse immunologique d'un vaccin antigrippal et peut fournir une protection systémique accrue contre l'infection (Olivares *et al.*, 2007).

Chapitre II : Les bactéries lactiques

Mikelsaar et Zilmer (2009) ont attribué à la souche *Lb. fermentum* ME-3 deux propriétés fonctionnelles: une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes intestinaux et une activité antioxydante élevée

Une des souches de *Lb. fermentum* potentiellement étudiées pour ses propriétés est : *Lactobacillus fermentum* RC-14, isolée à partir du tractus urogénital d'une femme saine. Heinemann *et al.*, (2000) ont montré que cette souche libère des composants tensio-actifs qui peuvent inhiber l'adhérence des bactéries uropathogènes, alors que Reid *et al.*, (2003) ont rapporté que sa combinaison avec *Lb. rhamnosus* GR-1 peut réduire la colonisation du vagin par des bactéries pathogènes et des levures potentielles.

La même souche s'est avérée sécrétrice d'un bio-tensioactif et elle inhibe de manière significative l'infection par *Staphylococcus aureus* et l'adhérence des bactéries aux implants chirurgicaux (Gan *et al.*, 2002).

1. Définition

Un milieu de culture est défini comme une préparation destinée au développement, au transport, à la sélection et à la conservation des microorganismes (Harley *et al.*, 2010), il doit satisfaire aux besoins nutritifs des microorganismes en carbone, en azote, ions minéraux, et en facteurs de croissance. Ainsi, il doit leur garantir des conditions physico-chimiques proches de leur écosystème naturel (Baudry *et al.*, 2006).

2. Classification

Les milieux de culture peuvent être classés selon :

2.1. La composition

- Les milieux naturels : c'est des milieux formulés à base de substrats naturels : milieu au miel, au lactosérum, au lait, à l'extrait de viande...etc.
- Les milieux semi-synthétiques : la composition exacte de certains constituants est connue, mais, on ne maîtrise pas la composition de substances organiques particulières comme les peptones, ou les extraits en tout genre.
- Les milieux synthétiques : sont chimiquement bien définis et utilisés pour l'étude de la culture des microorganismes autotrophes, ou auxotrophes.
- Les milieux complexes: de réalisation empirique (extraits de viande, de levure, extraits enzymatiques, protéines ou peptones).permettant la croissance de plusieurs espèces bactériennes (Branger *et al.*, 2007).

2.2. L'utilisation

- Milieux sélectifs : ils permettent la croissance des microorganismes recherchés tout en inhibant le développement des autres germes, ils contiennent donc des agents sélectifs appelés inhibiteurs.
- Milieux d'enrichissement : c'est des milieux liquides qui contiennent des agents sélectifs et qui sont destinés à enrichir le milieu en germe recherché.
- Milieux d'isolement et d'identification : ils sont utilisés pour l'isolement des espèces, d'autres pour l'identification parce qu'ils peuvent mettre en évidence une ou plusieurs propriétés chez un microorganisme précédemment isolé (Meyer *et al.*, 2004).

3. Milieux de culture des bactéries lactiques

Vu que les bactéries lactiques sont extrêmement exigeantes, elles nécessitent des milieux riches qui contiennent des composants comme les acides aminés, les peptides, les vitamines, et les acides nucléiques (Krzywonos et Eberhard 2011). Le premier milieu élaboré était à base de jus de tomate développé par Kulp en 1927 pour bien cultiver *Lb. acidophilus* et *Lb. bulgaricus* qui se développaient mal sur le milieu peptone-sucre-agar. Ensuite, plusieurs formulations ont été testées pour améliorer la croissance des bactéries lactiques jusqu'à l'apparition du milieu MRS développé par de Man *et al.*, en 1960 pour les lactobacilles. Mais ce dernier ne semblait pas efficace pour les streptocoques d'où l'apparition des milieux M16, puis M17. Et malgré l'invention de plusieurs autres milieux (Tableau 3), les milieux MRS et M17 restent les milieux commerciaux les plus utilisés (Hayek et Ibrahim, 2013).

Tableau 3: Milieux utilisés pour les bactéries lactiques (Hayek, 2013)

Milieu	Souche lactique	Référence
LB : Lysogeny Broth	Lactobacilles et Streptocoques	Bertani, 1951
RA : Rogosa agar	Lactobacilles	Rogosa <i>et al.</i> , 1951
BRIGGS: Tomato juice-Agar	Lactobacilles	Briggs, 1953
ST: <i>Streptococcus thermophilus</i> agar	Streptocoques	Guss et Delwiche, 1954
LAE : Lactic-agar-Elliker	Streptocoques	Elliker <i>et al.</i> , 1956
RCA: Reinforced colstridial agar	Lactobacilles et Lactocoques	Ellner, 1956; Smith, 1961
MRS : de Man-Rogosa Sharpe	Lactobacilles	de Man <i>et al.</i> , 1960
M17 : Ascorbic acid, di-sodim-Glycero-phosphate	Streptocoques	Terzaghi et Sandine 1975
TPPY: Tryptose proteose peptone yeast extract	Lactobacilles et Streptocoques	Bracquart, 1981
LAMVAB : <i>Lactobacillus</i> anaerobic MRS agar with Vancomycin and Bromocresol green	Lactobacilles	Hartemink, Domenech, et Rombouts, 1997
LDS: Lactobacilli-Streptococci Differential	Lactobacilles et Streptocoques	Eloy et Lactose, 1997

4. Formulation de nouveaux milieux de culture et leurs optimisations

4.1. Formulation

Avec le développement des industries qui utilisent les microorganismes d'intérêt technologique, des recherches approfondies ont été consacrées pour déterminer les besoins nutritionnels de ces microorganismes et pour formuler et optimiser des milieux qui leur sont efficaces.

Le but de ces études est l'atténuation des coûts de certains composants des milieux qui reviennent chers lors de leur utilisation à grande échelle. Ainsi, des travaux ont été réalisés pour éliminer ou remplacer ces substrats par des :

- Substrats végétaux : les dattes (Nancib *et al.*, 2001), les céréales (Charalampopoulos *et al.*, 2002), le pois (Kassas *et al.*, 2015) et le lupin (Hanoune *et al.*, 2015).
- Sous-produits alimentaires : comme le lactosérum (Omar *et al.*, 1993 ; Rodrigues, 2006, Hanoune *et al.*, 2015).
- Déchets notamment ceux de l'industrie de poisson ou autres (Aspmo *et al.*, 2005 ; Horn *et al.*, 2005 ; Safari *et al.*, 2009 ; Vazquez et Murado, 2008).

4.2. Optimisation

L'optimisation des milieux est l'un des paramètres critiques les plus étudiés avant toute production de métabolites à grande échelle (Singh *et al.*, 2017). Une souche qui a été caractérisée pour avoir un rôle biotechnologique demandé doit être produite en grande quantité pour satisfaire les besoins des industries en biomasse nécessaire.

De même, une souche sélectionnée pour une production bien définie (enzymes, bactériocines, acides ...) doit être cultivée dans des conditions et en présence de substrats qui permettent une production optimale de ces métabolites.

Le besoin d'optimiser la production de biomasse et/ou de métabolites a rendu nécessaire l'optimisation des milieux et des conditions de culture afin de maximiser les rendements.

Cette optimisation peut être réalisée par plusieurs techniques présentées dans la figure n° 1.

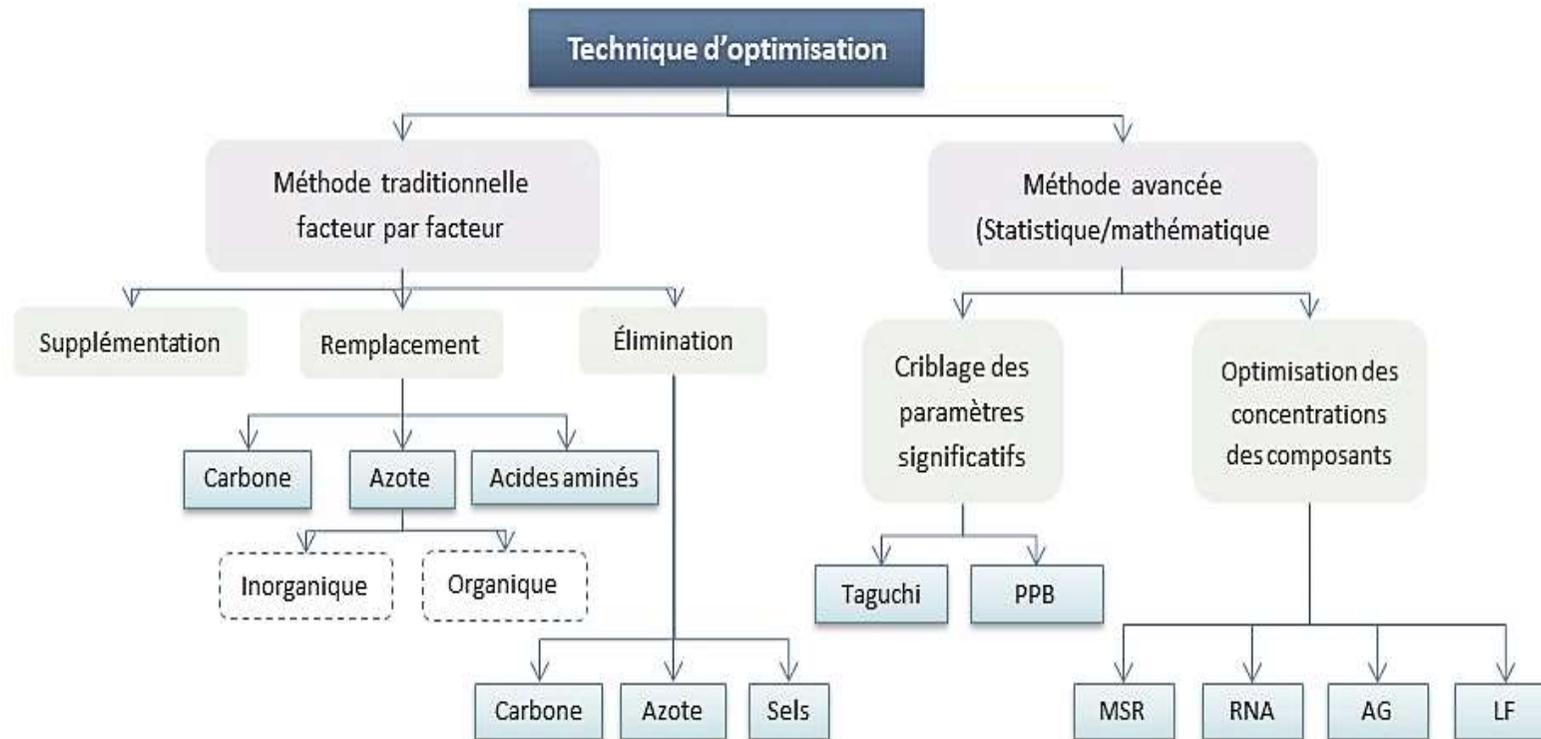


Figure 1: Représentation schématique des diverses techniques utilisées dans les études d'optimisation (Singh *et al.*, 2017)

Chapitre III : Les milieux de culture

4.2.1. Méthode classique « facteur par facteur »

C'est le modèle le plus traditionnellement utilisé dans tous les domaines d'études. L'étude d'un nombre de facteurs sur une ou plusieurs réponses nécessite l'étude de l'effet de chaque variable «séparément», et ce, en stabilisant les niveaux de tous les facteurs et en variant le niveau du facteur étudié. Bien que cette méthode soit très utilisée, elle présente des inconvénients majeurs, car elle exige beaucoup d'essais, beaucoup de temps et des fois des coûts très élevés. En plus, cette méthode néglige l'interaction entre les facteurs, ce qui peut donner des résultats qui sont loin des niveaux optimaux réels lorsqu'il s'agit de facteurs dont l'interaction entre eux influence significativement la réponse étudiée.

4.2.2. Méthodes avancées

Il s'agit de méthodes statistiques et mathématiques. Pour le criblage des effets des facteurs, le plan de Taguchi et le plan d'expériences de Plackett et Burman sont les plus utilisés.

L'étape de l'optimisation des niveaux des facteurs peut être réalisée par plusieurs méthodes mathématiques, à savoir : le réseau neuronal artificiel (RNA), l'algorithme génétique (AG), l'algorithme d'optimisation de Nelder Mead (NM), la logique floue (LF), mais la méthodologie des surfaces de réponse (MSR) est la plus rencontrée dans la littérature.

Donc en général, pour le criblage et l'optimisation des facteurs, les plans d'expériences MSR constituent l'outil avancé le plus utilisé pour l'optimisation des milieux.

Chapitre III : Les milieux de culture

4.2.2.1. Plans d'expériences

Les plans d'expériences organisent mieux l'expérimentation d'une recherche scientifique, ils sont applicables à de nombreuses disciplines et permettent d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expériences.

Dans un plan d'expérience, l'expérimentateur détermine à chaque essai « la réponse » qui dépend de plusieurs « variables » dont l'influence est étudiée entre deux niveaux : « le niveau bas » et « le niveau haut ». Chaque expérience est représentée par un point dans ce système d'axes, un plan d'expériences est alors représenté par un ensemble de points expérimentaux. Il existe deux types de plans :

4.2.2.1.1. Plans factoriels complets

Il s'agit d'un remplissage de l'espace de façon régulière dans le domaine expérimental, plus le nombre de niveaux sera important plus le remplissage de l'espace sera satisfaisant mais cela entraîne un nombre énorme d'expériences (Franco, 2008). Ce qui n'est pas économique et réalisable sur le plan pratique (Luftig et Jordan, 1998).

4.2.2.1.2. Plans factoriels fractionnaires

Dans les plans fractionnaires, l'expérimentation n'est qu'une fraction des essais du plan complet qui inclue tous les effets principaux et toutes les interactions, alors que la plupart de ces dernières ne présentent aucun intérêt pour l'expérimentateur. Bien que les plans fractionnaires réalisent des économies d'expériences, des contreparties et des ambiguïtés peuvent survenir lors de l'interprétation des résultats surtout dans le cas où le degré de fractionnement du plan complet est plus grand (Hoinard, 2009).

4.2.2.2. Planification d'une optimisation par les plans d'expériences

Une étude réalisée dans ce contexte consiste en général à étudier d'abord les effets des facteurs du milieu qui agissent significativement sur la réponse (croissance ou bien production). La deuxième étape consiste à optimiser les niveaux des facteurs sélectionnés et l'étude aboutit à l'élaboration d'une formule optimale d'un milieu qui garantit la production maximale de la souche ou du produit désiré.

4.2.2.2.1. Plans pour screening

Ces plans permettent de choisir parmi les « n » facteurs étudiés, ceux qui influencent significativement la réponse.

Chapitre III : Les milieux de culture

a. Plan de Plackett et Burman

Le plan Plackett et Burman (1946) est un plan factoriel fractionné très utilisé comme outil de criblage car le nombre d'expériences proposés est proche du nombre de facteurs étudiés ($n+1$). Les essais sont réalisés selon une matrice dite « Matrice d'Hadamard » qui propose pour chaque facteur deux niveaux à étudier : (-1) pour le niveau minimal et (+1) pour le niveau maximal.

b. Plan de Taguchi

Taguchi propose l'utilisation des plans expérimentaux dits « arrangements orthogonaux ». C'est une conception factorielle qui indique l'influence de différents paramètres sur une réponse donnée par un petit nombre d'expériences au lieu de tester toutes les combinaisons possibles (Clément, 2000). Grâce à cette approche, on peut déterminer une combinaison des paramètres de conception de sorte que la réponse peut être proche de la cible souhaitée (Bhartia *et al.*, 2010).

4.2.2.2.2. Plans pour L'optimisation des niveaux des facteurs

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) consiste en un groupe de techniques mathématiques et statistiques utilisées dans le développement d'une relation fonctionnelle adéquate entre une réponse d'intérêt et un nombre de variables. Cette relation peut être approchée par un modèle polynomial (Khuri et Mukhopadhyay, 2010).

Les surfaces de réponse sont des plans du deuxième degré et constituent la deuxième étape après le criblage des facteurs, elles n'utilisent que les facteurs précédemment jugés influents (Vivier, 2002) et visent à déterminer quantitativement les variations de la réponse en fonction des facteurs qui l'influencent significativement.

D'après la littérature, les plans du second degré les plus utilisés pour l'optimisation des milieux sont :

a. Plan composite centré

Le plan composite central (PCC) a été décrit par Box et Wilson (1951). La matrice est en réalité la réunion de 3 séries de points :

- les expériences d'un plan factoriel complet ou fractionnaire à 2 niveaux par facteur
- Les expériences axiales placées sur les axes propres au plan.

Chapitre III : Les milieux de culture

- Les expériences au point central (Vivier, 2002).

Le nombre d'expériences pour un plan composite central est : $n = 2^k + 2k + c_0$ (où k est le nombre de facteurs et c_0 est le nombre de points centraux) (Ferreira *et al.*, 2007)

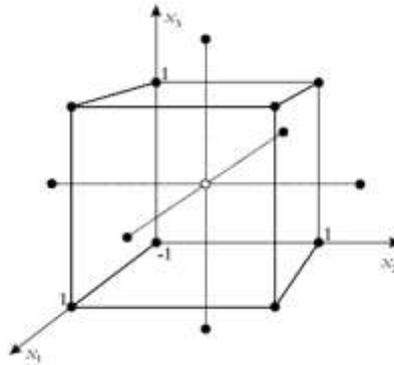


Figure 2: Plan composite central pour trois facteurs (Vivier, 2002)

b. Plan de Box Behken

Le plan Box-Behnken est une conception du second degré qui est rotative ou presque rotative basée sur des modèles factoriels incomplets à trois niveaux. Le nombre d'expériences est défini comme : $n = 2k(k-1) + c_0$ (Ferreira *et al.*, 2007).

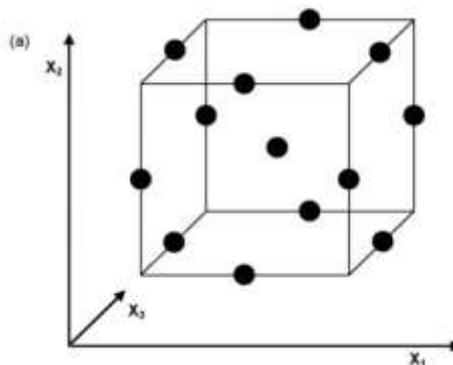
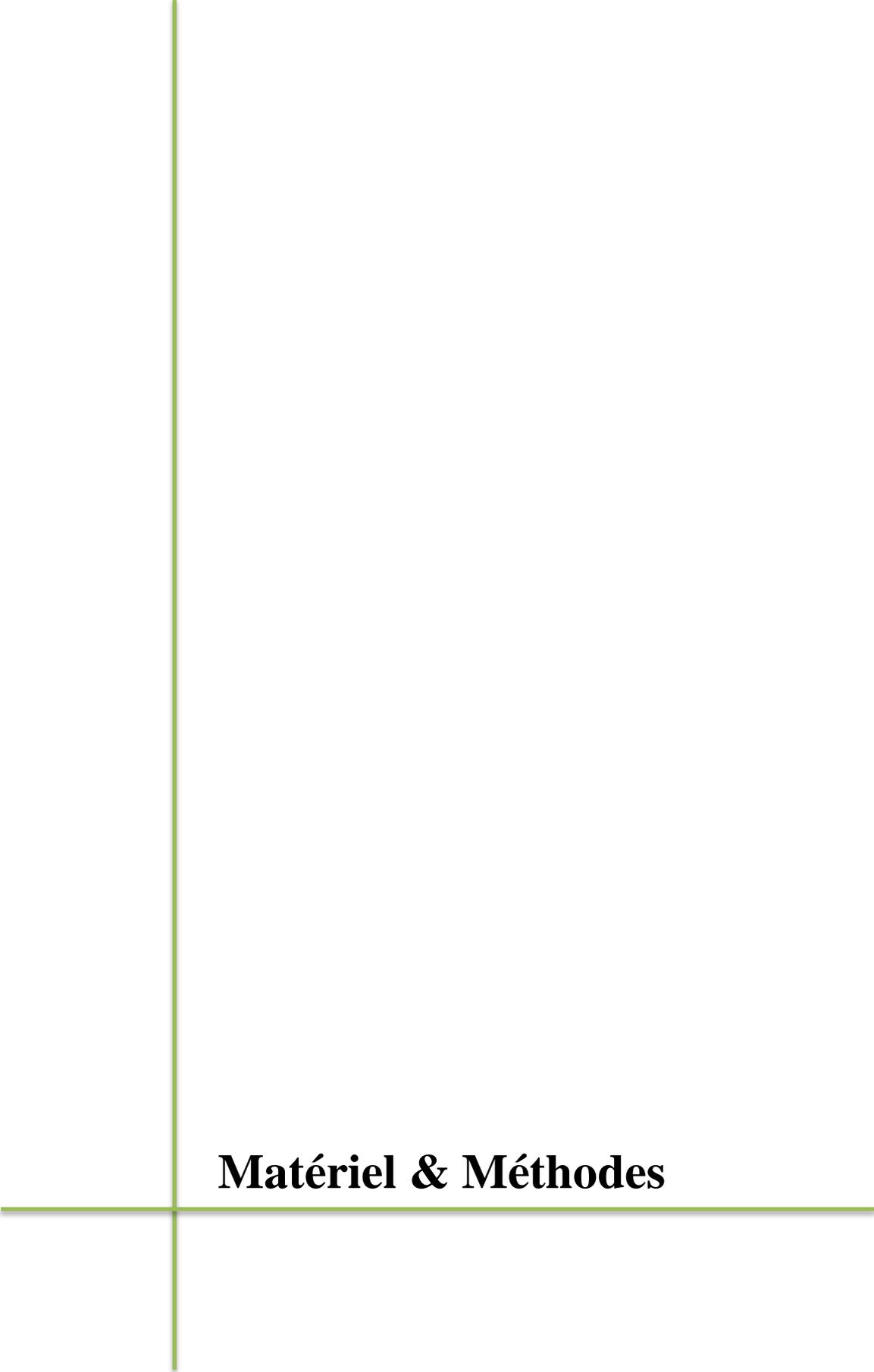


Figure 3: Plan Box-Behnken pour trois facteurs (Ferreira *et al.*, 2007)



Matériel & Méthodes

1. Lactobacilles :

1.1. Origine

Quatre souches de lactobacilles provenant de différentes sources sont utilisées :

- ***Lactobacillus brevis* CHTD27 et *Lactobacillus plantarum* BH14**

Ils sont fournis sur gélose inclinée par le Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB), Essenia Oran, Algérie. Les souches ont été isolées à partir de lait de chamelle cru collecté dans la région de Tindouf (Zadi-Karam et Karam, 2006).

- ***Lactobacillus rhamnosus* sp.**

Isolé par Boukhemis., M. à partir de fèces de bébés allaités au sein dans le cadre du projet de recherche : « Isolement et caractérisation de souches autochtones de bactéries lactiques en vue de leur utilisation dans la fabrication de produits fermentés à effets probiotiques » dirigé par Djeghri., B.

- ***Lactobacillus fermentum* DSM 20049**

Il provient de la collection de culture DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) et nous a été offert gracieusement par le professeur Abdeltif Amrane (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes- France) sous forme de pastille.

1.2. Revivification et conservation des souches

Les souches sont repiquées régulièrement chaque mois sur milieux MRS liquide et solide. Leur pureté est vérifiée par l'étude du Gram, l'observation de la forme et de l'arrangement cellulaire, ainsi que l'étude de la catalase. La conservation se fait sur gélose MRS inclinée à 4°C et sur lait congelé à -20°C.

1.3. Préparation des milieux de culture pour la croissance des souches lactiques

Les hydrolysats préparés comme indiqué dans la page 38 sont utilisés comme base pour formuler les milieux solides et liquides. Pour les milieux solides, l'agar est additionnée et le mélange est bien agité sur une plaque chauffante à 50°C jusqu'à la dissolution complète. Le pH des milieux est ajusté aux pH désirés, puis ces derniers sont alors répartis dans des flacons avant d'être autoclavés.

1.4. Préparation de l'inoculum et ensemencement

L'inoculum (culture mère) est préparé en ajoutant une colonie au bouillon MRS et en l'incubant à 37°C pendant 18h.

Les milieux liquides formulés sont inoculés avec 3% de la culture mère préalablement standardisée à une DO (600 nm) de 0.6 à l'aide d'un spectrophotomètre, puis incubés à 37°C pendant 24h. Les milieux solides sont ensemencés en surface par des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-7}) préparées à partir de la culture mère et sont incubés à 37°C pendant 48 à 72 h.

1.5. Estimation du potentiel de croissance

1.5.1. Sur milieu liquide

Après incubation, la croissance est estimée en mesurant les densités optiques des échantillons à 600 nm. Les échantillons sont dilués avec leurs milieux respectifs pour assurer une valeur de DO inférieure à 0,6.

1.5.2. Sur milieu solide

La croissance sur les différents milieux est estimée par le dénombrement des colonies apparues, elle est exprimée en nombre UFC/ml et calculée selon la loi de Guiraud (2004) :

$$N = \frac{\sum c}{[v(n_1 + 0,1n_2)d_1]}$$

N= nombre total des colonies

$\sum c$ = somme des nombres de colonies

v = volume ensemencé

n_1 : nombre de répétions pour la première dilution

n_2 : nombre de répétions pour la deuxième dilution

d_1 : la plus grande dilution

2. Sous-produits d'abattoir

2.1. Préparation des matières premières

2.1.1. Préparation de la pâte d'intestins de poulet

Les intestins de poulet sont collectés au niveau de l'abattoir (Ben Merabet-Annaba) juste après l'abattage et lavés soigneusement sous robinet afin de les débarrasser de leur contenu, ensuite, ils sont soumis à un broyage pendant 2 minutes dans un mixeur et congelés dans des boîtes de 1 Kg à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.1.2. Préparation de la farine de sabots de mouton

Les sabots de mouton proviennent directement de l'abattoir de Seybouse-Annaba, ils sont lavés puis séchés au four à 50°C jusqu'à poids constant. Ensuite ils sont broyés dans un mixeur et la poudre ainsi obtenue est conservée au congélateur à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.2. Préparation des hydrolysats

2.2.1. Hydrolyse des intestins de poulet

2.2.1.1. Autolyse

La pâte d'intestins est hydrolysée selon le protocole optimisé par Jamdar *et al.*, (2005) et faisant agir les enzymes endogènes des intestins dans des conditions acides (Fig.4 : a). L'hydrolysate obtenu est appelé: « Hydrolysate autolytique des Intestins de poulet » : HAIP.

2.2.1.2. Hydrolyse enzymatique

Cette hydrolyse est réalisée grâce à l'action de la papaïne fournie gracieusement par une brasserie d'Annaba selon le protocole décrit dans la figure n°4 (b), l'hydrolysate ainsi obtenu est dénommé « Hydrolysate Enzymatique des Intestins de Poulet » : HEIP.

2.2.2. Hydrolyse des sabots de mouton

2.2.2.1. Hydrolyse chimique

La farine de sabots est traitée avec de l'HCl 2N, l'hydrolysate récupéré est appelé: « Hydrolysate Chimique des Sabots de Mouton » HCSM. (fig.4 : c)

2.2.2.2. Hydrolyse enzymatique

Matériel & Méthodes

L'hydrolyse enzymatique du mélange farine- eau est effectuée avec de la papaine selon le protocole présenté dans la figure n°4 (d) pour obtenir « l'Hydrolysate Enzymatique de Sabots de Mouton » HESM.

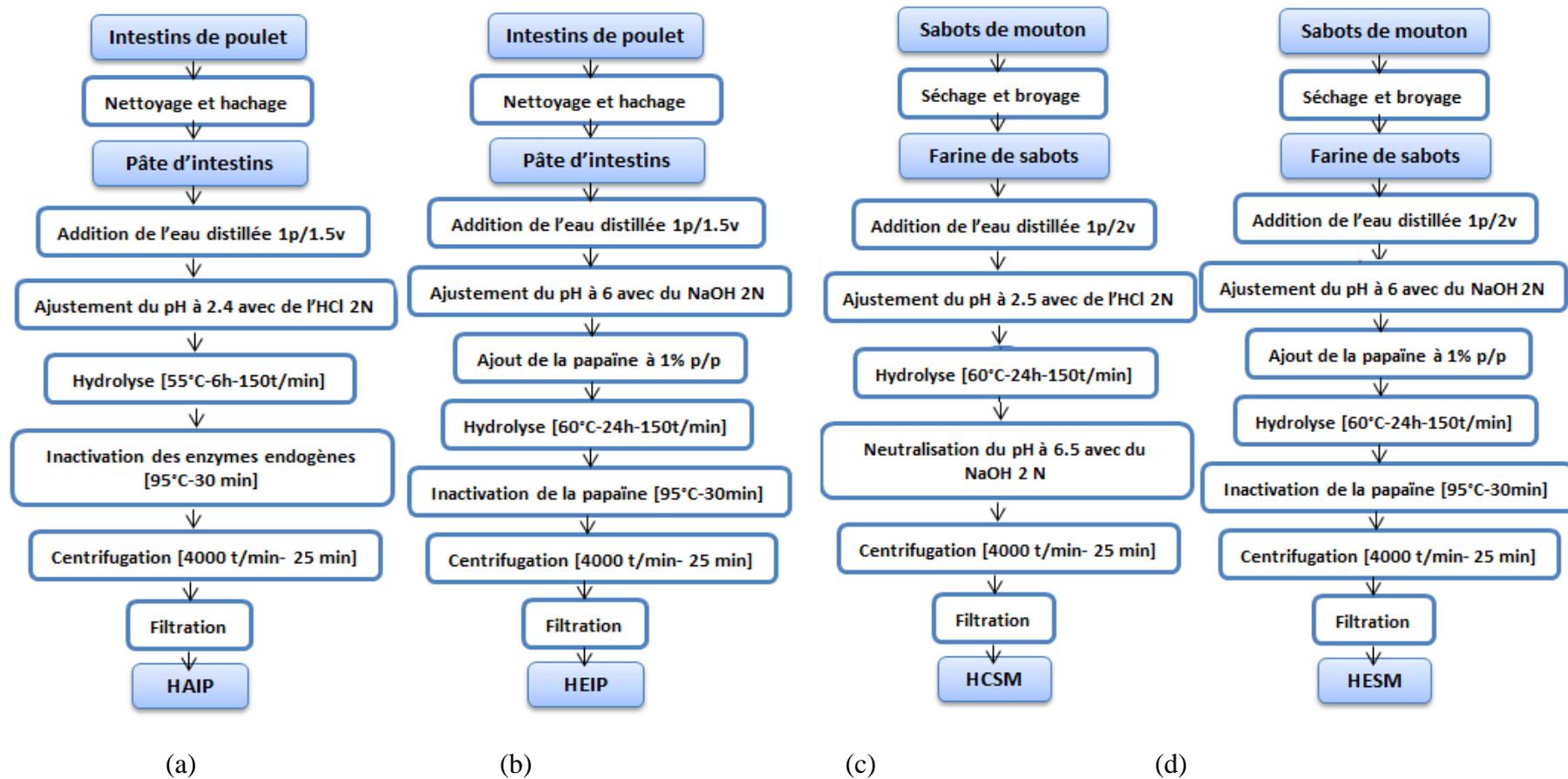


Figure 4: Schémas d'obtention des hydrolysats : HAIP (a), HEIP (b), HCSM (c) et HESM (d)

2.3. Étude de l'efficacité de la méthode d'hydrolyse

Pour chaque sous-produit, deux types d'hydrolyse ont été testés. L'efficacité de la méthode est révélée par le degré d'hydrolyse du sous-produit et le pouvoir de l'hydrolysât à supporter la croissance de *Lb. plantarum* en milieu liquide et sur milieu solide.

2.3.1. Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse est mesuré en quantifiant l'azote non-protéique soluble dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA). Pour ce faire, un volume d'hydrolysât est mélangé avec un volume de TCA 20% et le mélange est incubé pendant 30 minutes.

Après centrifugation à 6000 t/min pendant 20 min, le surnageant est récupéré et sa teneur en azote est estimée par la méthode de Lowry (Annexe 2). Le degré d'hydrolyse est calculé comme suit :

$$DH (\%) = \frac{\text{Azote soluble dans le TCA10\%}}{\text{Azote total de l'échantillon}} \times 100$$

2.3.2. Croissance de *Lb. plantarum* sur les milieux à base des différents hydrolysats

La croissance de *Lb. plantarum* est estimée comme cité précédemment sur les quatre hydrolysats dont les pH ont été ajustés à pH 6.5.

2.4. Rendement d'hydrolyse

Au cours de l'étude, et pour chaque substrat, une moyenne des volumes des hydrolysats obtenus à chaque hydrolyse est calculée, celle-ci est rapportée aux poids des sous-produits utilisés afin d'estimer le rendement du processus d'hydrolyse.

2.5. Caractérisation physicochimique des matières premières et leurs hydrolysats

Les matières premières ainsi que leurs hydrolysats ont été caractérisés en estimant leurs poids sec, leur taux de cendres et leurs teneurs en protéines, en lipides et en sucres.

2.5.1. Détermination de la matière sèche (Le coq, 1965)

La matière sèche est estimée après le séchage des échantillons dans un creuset en porcelaine préalablement taré à 105°C jusqu'à poids constant. Elle est calculée par la relation:

$$MS\% = M_1 / M_0 \times 100 (\%)$$

Où :

M_1 : Masse finale de l'échantillon (après séchage) (g).

M_0 : Masse initial de l'échantillon (g).

MS : Matière sèche

2.5.2. Détermination de la matière minérale (Le coq, 1965)

Les échantillons sont mis dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures. Le taux de cendres est calculé comme suit :

$$MM\% = M_2/M_1 \times 100 \%$$

M_2 : Masse finale de l'échantillon (après incinération) (g).

M_1 : Masse finale de l'échantillon (après séchage) (g).

MM : Matière minérale.

2.5.3. Dosage des protéines totales

La méthode utilisée est celle développée par Lowry et ses collaborateurs en 1951.

C'est une combinaison de la réaction de biuret et la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. D'abord, les ions de cuivre forment un complexe avec l'azote des liens peptidiques de la protéine en milieu alcalin et le Cu^{2+} est réduit au Cu^+ . Ensuite, le phosphomolybdate et le phosphotungstate contenus dans le réactif de Folin réagissent avec les tyrosines et les tryptophanes des protéines produisant une couleur bleue.

La concentration en protéines est estimée par rapport à une courbe étalon établie avec une solution standard d'albumine de sérum de bœuf (BSA). Le protocole et la courbe d'étalonnage sont donnés en annexe 2.

2.5.4. Dosage des sucres totaux

La méthode « phénol-acide sulfurique a été proposée par Dubois et *al.*, en 1956. L'acide sulfurique décompose tous les polysaccharides, oligosaccharides, et disaccharides en monosaccharides. Les pentoses sont alors déshydratés en furfural, les hexoses) en hydroxyméthyl-furfural. Les composés ainsi produits réagissent avec le phénol produisant une couleur jaune-orangé (Nielsen, 2010). L'absorption est mesurée à 490 nanomètre et la teneur en sucres

est exprimée par rapport à une droite étalon élaborée avec une solution de glucose à 100 µg/ml (Annexe 3).

2.5.5. Dosages des lipides

C'est une méthode simple proposée par Folch et *al.*, en 1957. Elle consiste à homogénéiser l'échantillon avec un mélange de chloroforme-méthanol et laver l'extrait par l'addition d'eau ou d'une solution saline appropriée. Le mélange se sépare en deux phases. La phase inférieure constitue l'extrait total pur de lipides. Le protocole est décrit en annexe 4.

2.5.6. Dosage de l'azote total (la méthode de Kjeldhal, 1883)

L'azote se trouve naturellement sous deux formes : organique et minérale. Pour le doser il faut qu'il soit sous sa forme minérale. Donc pour le dosage de la totalité de l'azote d'un échantillon biologique, la fraction organique est d'abord minéralisée, puis estimée par à un dosage acide-base (annexe 5).

3. Formulation et optimisation des milieux de culture pour la croissance des souches lactiques:

3.1. Sélection des paramètres du milieu influençant la croissance : Plan de Plackett et Burman

Le plan Plackett et Burman (1946) est utilisé comme outil de criblage, les variables sont les paramètres des milieux (k) et la réponse étudiée est la croissance observée (\hat{y}), le nombre d'essai est alors ($k+ 1$). le modèle mathématique est sous la forme :

$$\hat{y} = a_0 + \sum a_i X_i$$

Où :

\hat{y} : la réponse (croissance observée)

a_0 : constante

a_i : coefficient de régression du facteur X_i

X_i : Facteur indépendant

Les essais sont réalisés selon une matrice dite « Matrice d'Hadamard » (Tableau 4), celle-ci propose pour chaque facteur deux niveaux à étudier : (-1) pour le niveau minimal et (+1) pour le niveau maximal (Tableau 5).

Onze facteurs ont été étudiés incluant les ingrédients du milieu qui sont : X1 : le glucose, X2 : l'extrait de levure, X3 : le citrate d'ammonium, X4 : le phosphate de potassium, X6 : le sulfate de magnésium, X7 : le sulfate de manganèse, et X8 : le tween 80, les paramètres physicochimiques représentés par le pH (X9) et l'agitation (X10) et enfin deux facteurs erreurs (X5 et X 11).

Donc pour étudier l'influence des onze paramètres, douze milieux de culture sont formulés selon la matrice proposée par le modèle. Les quatre lactobacilles testés sont cultivés sur ces milieux et leur croissance estimée par la DO 600 nm est considérée comme réponse.

L'analyse des résultats permettra d'identifier, parmi ces facteurs, ceux qui influencent significativement la croissance tout en montrant la nature de l'effet exercé : positif ou négatif. Cependant, ce plan détermine seulement l'impact des facteurs, mais ne définit pas leurs valeurs optimales.

Tableau 4: Matrice d'expériences de Plackett et Burman (1946) pour onze facteurs

N° d'essai	Facteurs										
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

+1: Niveau maximal

-1: Niveau minimal

Tableau 5: Paramètres du milieu et leurs niveaux étudiés

Facteurs	Symbole	Niveau minimal (-1)	Niveau maximal (+1)
Glucose (g/L)	X_1	0	20
Extrait de levure (g/L)	X_2	0	5
Citrate d'ammonium (g/L)	X_3	0	2
Phosphate de potassium (g/L)	X_4	0	2
Erreur	X_5	–	–
Sulfate de magnésium (g/L)	X_6	0	0,2
Sulfate de manganèse (g/L)	X_7	0	0,05
Tween 80 (ml)	X_8	0	1
pH	X_9	5.8	6.5
Agitation (t/min)	X_{10}	0	150
Erreur	X_{11}	–	–

X_5 et X_{11} sont les facteurs erreurs

Après analyse des résultats, les effets des différents facteurs sur la réponse sont illustrés par « le diagramme de Pareto » sous forme de barres dont les longueurs sont proportionnelles aux effets.

3.2. Optimisation des milieux

Pour chaque souche étudiée sur un substrat donné, les facteurs qui influencent sa croissance positivement et qui sont sélectionnés par le PPB doivent être optimisés pour maximiser sa croissance. S'il s'agit d'un seul facteur, le milieu est optimisé par le fait de tester différents niveaux de ce facteur afin d'avoir une croissance optimale de la souche étudiée. S'il s'agit de deux facteurs ou plus, le plan central composite PCC est proposé pour l'optimisation. Celui-ci détermine à la fois le niveau optimal de chaque facteur et l'interaction entre les facteurs, il teste chaque facteur à cinq niveaux (tableau 6).

Le but de cette étude est de maximiser la croissance des bactéries lactiques en tenant compte des facteurs sélectionnés par le plan de Plackett et Burman pour avoir donné un effet « significatif » et « positif » sur la croissance. Ces derniers sont insérés dans le plan composite centré, alors que les autres facteurs sont éliminés.

Tableau 6: Plan composite centré à deux facteurs

N° d'expérience	X1	X2
1	-1,00000	-1,00000
2	1,00000	-1,00000
3	-1,00000	1,00000
4	1,00000	1,00000
5	-1,41421	0,00000
6	1,41421	0,00000
7	0,00000	-1,41421
8	0,00000	1,41421
9	0,00000	0,00000
10	0,00000	0,00000
11	0,00000	0,00000
12	0,00000	0,00000
13	0,00000	0,00000

Les facteurs sont testés à cinq niveaux: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$. Pour un plan composite centré à deux facteurs : $\alpha = 1.41$.

La croissance de la souche testée (\hat{Y}) s'exprime par l'équation polynomiale du second degré:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Où :

\hat{Y} : la réponse : croissance

X_1, X_2 : les formes codées des variables explicatives ;

β_0 : la constante du modèle

β_1 et β_2 : les coefficients linéaires

β_{11} et β_{22} : les coefficients quadratiques

β_{12} : le coefficient d'interaction.

Après traitement statistiques, les résultats de l'optimisation sont illustrés sous forme d'une courbe à trois dimensions : deux pour les facteurs, et une pour la réponse.

3.3. Analyse statistique

Le test de Student est utilisé pour définir la signification des facteurs, les variables ayant des niveaux de confiance supérieurs à 95% sont considérés comme significatifs.

L'interprétation des résultats et la réalisation des diagrammes de Pareto sont réalisées à l'aide du logiciel MINITAB version 16, les courbes tridimensionnelles et les graphiques de contour sont tracés à l'aide du logiciel STATISTICA 12 statsoft.

3.4. Validation du modèle

Dans toute démarche expérimentale, les expériences de confirmations sont nécessaires pour valider les informations obtenues. Ici, la validation concerne les valeurs des effecteurs choisis comme optima pour induire une réponse maximale. Donc les valeurs optimales des facteurs sont retenues, et des tests de culture des souches lactiques sur des milieux incluant ces différentes valeurs sont réalisés. Enfin, pour s'assurer que le modèle est valide, on compare les résultats expérimentaux de croissance avec ceux prédits par le plan PCC.

4. Comparaison de la croissance sur les milieux optimisés avec le milieu standard MRS

4.1. Cinétiques de croissance

Les souches lactiques sont cultivées sur les milieux formulés à base de sous-produits optimisés pendant 24h à 37°C. Chaque deux heures, des échantillons sont prélevés et leur DO (600 nm) est estimée. Des courbes de croissance en fonction du temps sont tracées. Le milieu MRS est utilisé comme témoin.

4.2. Vitesse spécifique de croissance

La vitesse spécifique de croissance correspond à la vitesse d'évolution de la biomasse en fonction du temps rapportée à l'unité de biomasse, elle est mesurée pendant la phase exponentielle car à ce moment-là elle est maximale. Elle est calculée comme suit :

$$\mu_X = d\ln X / dt \quad (h^{-1})$$

Où :

μ_X : Vitesse spécifique de croissance

X: Biomasse exprimée en absorbance à 600.

t: temps (h)

5. Estimation approximative des coûts de production

Les coûts de production des différents hydrolysats ainsi que les milieux finaux optimisés ont été estimés approximativement en dinar Algérien (DA).

5.1. Coût de production d'un litre de chaque hydrolysat

5.1.1. Consommation d'énergie

Elle est estimée par le calcul de la puissance de l'appareil électrique utilisé exprimée en kilowattheure multiplié par le nombre d'heures pendant lesquelles l'appareil a fonctionné. Le coût de consommation des (KWh) est précisé par la Société Algérienne de l'Electricité et du Gaz (Algérie) SONEGAS (2016).

5.1.2. Consommation d'eau

Elle est estimée par le nombre de M³ d'eau consommés multiplié par le prix précisé par « l'Algérienne des Eaux » (2017).

5.1.3. Coût des intrants

Les produits et les réactifs utilisés sont de marque MERCK[®] (SIGMA ALDRICH[®]), ils incluent:

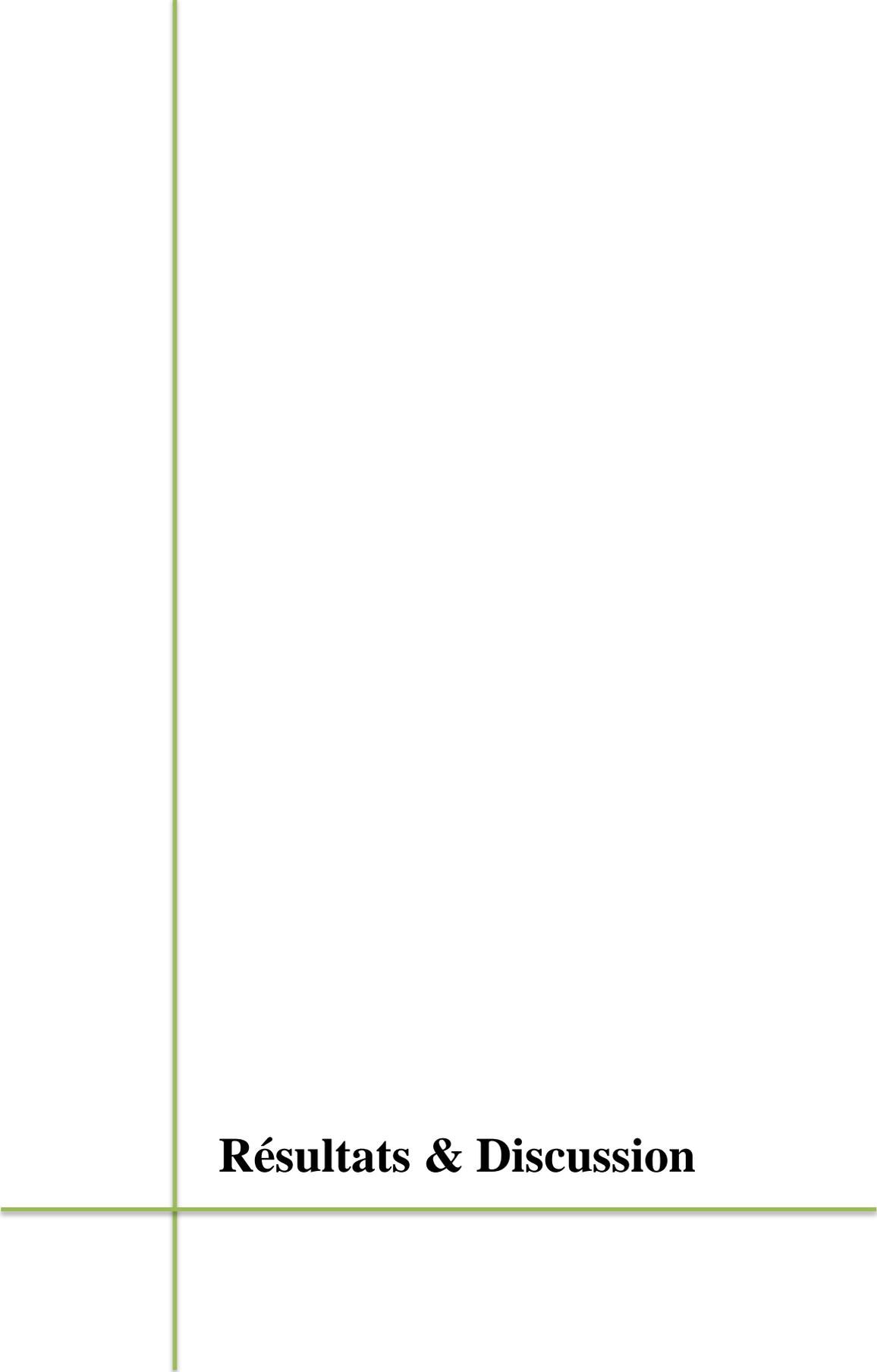
- Coût de la papaïne brut
- Coût des réactifs NaOH et HCl

5.2. Coût de production d'un litre de chaque milieu

Pour les milieux optimisés, les coûts des suppléments à ajouter (glucose, MnSO₄, citrate d'ammonium) de marque MERCK[®] sont additionnés aux coûts des hydrolysats calculés précédemment. Ceux-ci sont comparés aux coûts du milieu MRS commercial prêt à l'emploi ou préparé au niveau du laboratoire à partir des différents ingrédients.

6. Analyse statistique

Tous les résultats sont traités statistiquement par l'analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel MINTAB (version 16.0). Le seuil de signification : $p = 0.05$.



Résultats & Discussion

Résultats

1. Caractérisation physicochimique de la pâte d'intestins et de la farine de sabots

Les taux de protéine, de lipides et de matière minérale sont rapportés à la matière sèche et exprimés en pourcentage et sont rassemblés dans le tableau 7.

Tableau 7: Caractérisation physicochimique de la pâte d'intestins de poulet et de la farine de sabots de mouton

	Pate d'intestins de poulet	Farine de sabots de mouton
Matière sèche (%)	17.90 ± 0.24	92.75 ± 0.74
Azote total (%)	12.74 ± 0.48	14.81 ± 0.11
Protéines (%)	79.68 ± 3.02	92.60 ± 0.73
Lipides (%)	17.98 ± 1.22	2.81 ± 0.11
Cendres (%)	3.85 ± 0.03	3.77 ± 0.07

* Chaque valeur représente la moyenne de deux à trois essais et deux répétitions.

La farine de sabots et la pâte d'intestins se sont avérées riches en protéines, la fraction lipidique est importante dans l'intestin de poulet, elle représente le 1/5 de son poids sec.

2. Efficacité de la méthode d'hydrolyse

Pour chaque substrat, le degré d'hydrolyse de chaque hydrolysats (chimique ou enzymatique) ainsi que leurs supports de la croissance de *Lb. plantarum* sur milieu liquide ont été examinés pour choisir la meilleure méthode d'hydrolyse à appliquer dans la suite du travail.

2.1. Degré d'hydrolyse dans les quatre hydrolysats

Tableau 8: Influence de la méthode d'hydrolyse sur le degré d'hydrolyse

Hydrolysats	HAIP	HEIP	HCSM	HESM
Degré d'hydrolyse	7.39%	6.22%	5.21%	6.90%

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que pour les intestins, l'autolyse chimique au moyen des enzymes endogènes de l'intestin a donné l'hydrolysats ayant le plus haut degré d'hydrolyse et il dépasse celui issu de l'hydrolyse enzymatique avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$).

Pour les sabots de mouton, le degré d'hydrolyse du HESM issu de l'hydrolyse enzymatique est supérieur de façon très significative à celui produit par l'hydrolyse chimique (HCSM) ($p = 0.001 < 0.05$).

L'aspect des quatre hydrolysats est présenté dans la figure 5 :

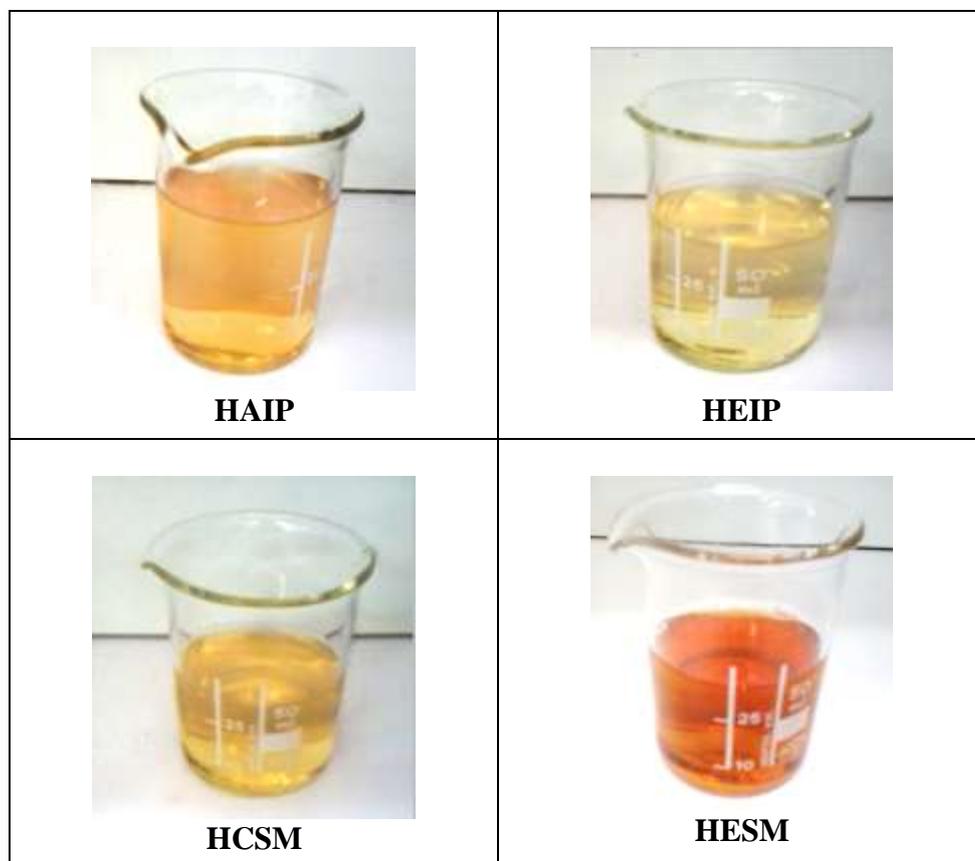


Figure 5: Aspects visuels des quatre hydrolysats: HAIP, HEIP, HCSM et HESM.

2.2. Croissance de *Lb. plantarum* sur les quatre hydrolysats

2.2.1. Sur milieu liquide

Lactobacillus plantarum a été cultivé sur des milieux liquides à base d'hydrolysats enzymatiques et chimiques des sabots de mouton et des intestins de poulet, les résultats sont montrés dans la figure 6.

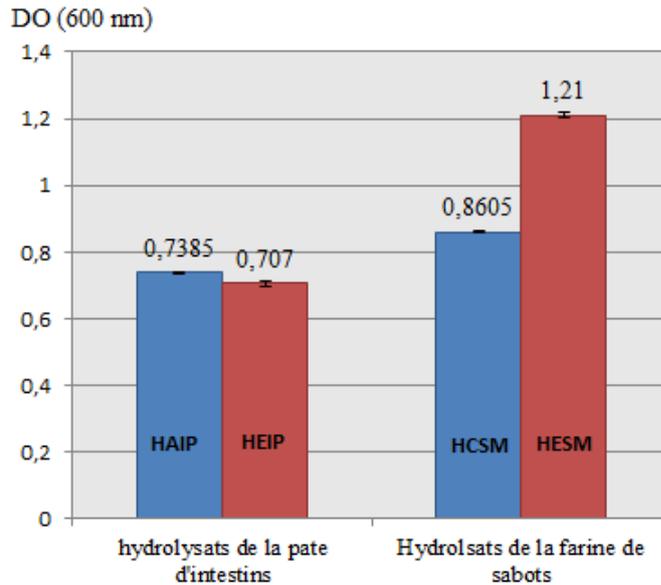


Figure 6: Croissance de *Lb. plantarum* sur les différents hydrolysats

2.2.2. Sur milieu solide

Pour les intestins de poulet, la croissance sur HAIP est significativement meilleure que celle obtenue sur l'hydrolysate HEIP ($p < 0.001$) (figure 7).

Contrairement aux intestins, l'hydrolyse enzymatique semble significativement plus efficace pour la farine de sabots par rapport à l'hydrolyse chimique ($p = 0.002$), ceci se traduit par un meilleur résultat de croissance de *Lb. plantarum* sur HESM.

Tableau 9: Potentiel de croissance sur les différents hydrolysats

	Potentiel de croissance (UFC)	Taille des colonies (mm)
HAIP	$1.31 \cdot 10^6$	0.5-2
HEIP	$1,22 \cdot 10^6$	0.5-2
HCSM	$0.91 \cdot 10^6$	0.4-2
HESM	$1.40 \cdot 10^6$	0.4-2

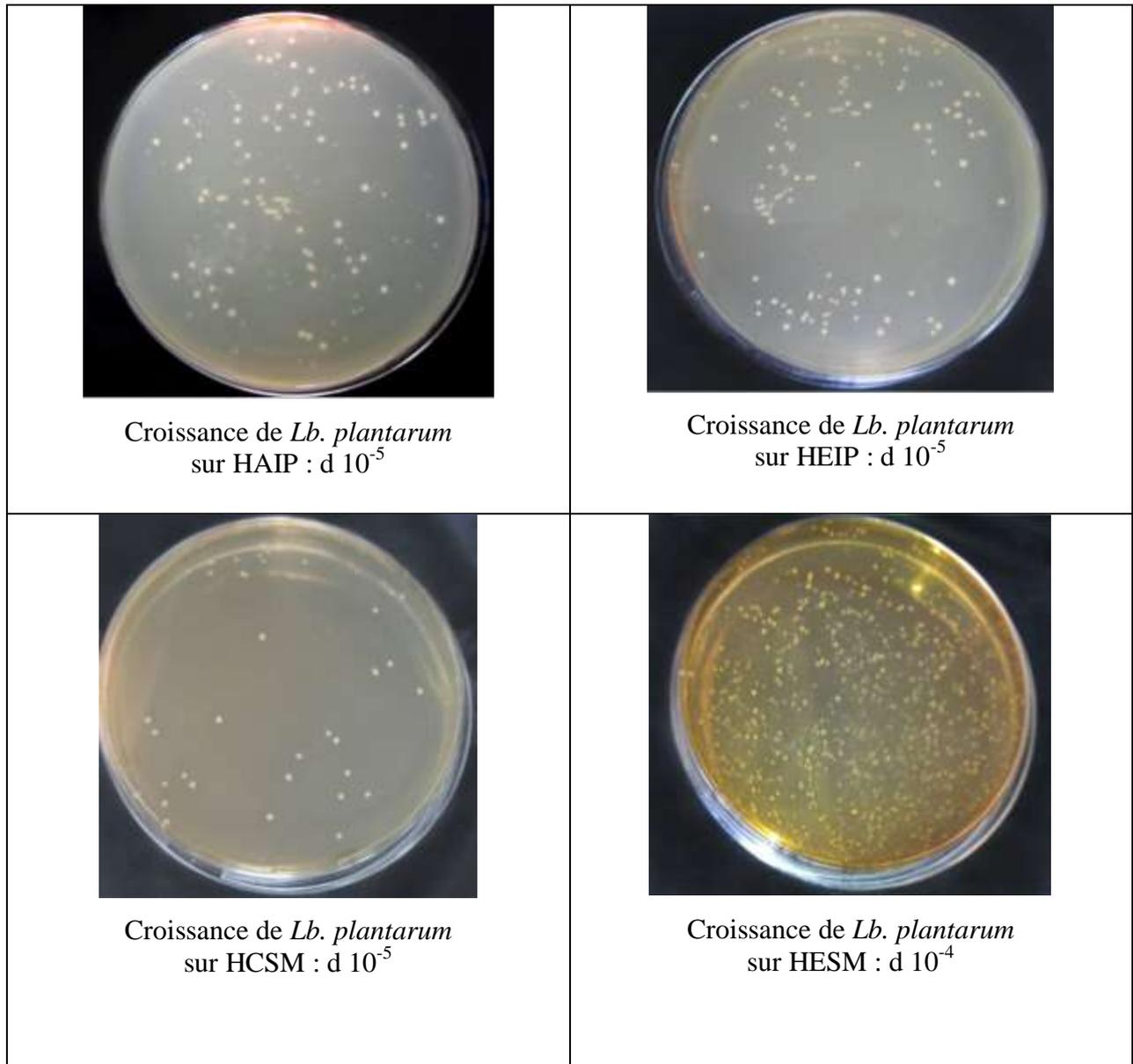


Figure 7: Croissance de *Lb. plantarum* sur les milieux solides à base des différents hydrolysats

Compte tenu des résultats obtenus, le HAIP issu des intestins de poulet et le HESM issu des sabots de mouton sont retenus pour être optimisés et utilisés comme milieux de base pour la croissance des quatre lactobacilles étudiés.

3. Composition physicochimique des hydrolysats choisis

Les hydrolysats ainsi choisis ont été caractérisés ; leur composition est montrée dans le tableau 10 qui montre que la fraction protéique est prépondérante dans les deux types d'hydrolyse révélant ainsi leur richesse en azote alors que les sucres totaux sont presque absents. La teneur en lipides est faible et elle est notablement diminuée dans les hydrolysats par rapport à celle trouvée dans les matières premières, car les phases lipidiques sont éliminées après centrifugation lors de la préparation des hydrolysats.

Tableau 10: Composition physicochimique des hydrolysats choisis

	HAIP	HESM
Sucres totaux (%)	0.26 ± 0.02	/
Protéines (%)	87.78 ± 0.09	90.22 ± 2.1
Lipides (%)	1.18 ± 0.22	1.21 ± 0.05
Cendres (%)	9.5 ± 0.7	6.32 ± 0.09

La caractérisation physicochimique des substrats constitue un préalable pour l'optimisation des milieux pour la croissance des lactobacilles.

Les fortes teneurs en protéines des matières premières et de leurs hydrolysats nous ont conduits vers la substitution de la source d'azote par les différents hydrolysats alors que leur pauvreté en sucres impose l'apport d'une source de carbone dans les milieux formulés. Donc les milieux de culture sont préparés à partir des mêmes ingrédients contenus dans le MRS et aux mêmes concentrations sauf que la source d'azote initialement constituée par l'extrait de bœuf et peptones est remplacée par les hydrolysats, issus soit de la farine de sabots, soit des intestins de poulet.

4. Rendement d'hydrolyse

Production du HAIP : 1000 g d'intestins produisent 1320 ml ± 20 ml

Production de HESM : 1000g de farine de sabots produit 1710 ± 52 ml

5. Formulation des milieux

5.1. Milieux pour *Lactobacillus brevis*

5.1.1. Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB

Les résultats de croissance sur les différents milieux estimés par la mesure de la densité optique et exprimé en DO 600 sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Croissance de *Lb. brevis* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman

<i>N° d'essai</i>	<i>Facteurs</i>											<i>DO (600 nm)</i>	
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>(X₅)</i>	<i>X₆</i>	<i>X₇</i>	<i>X₈</i>	<i>X₉</i>	<i>X₁₀</i>	<i>(X₁₁)</i>	HAIP	HESM
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	1.578	3,471
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	1.058	1,462
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	4.731	1,853
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0.374	1,891
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.600	1,942
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	0.443	2,160
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	3.166	4,114
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2.853	5,440
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	3.175	5,446
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1.042	1,288
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	4.098	2,679
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.330	1,002

(+1) : niveau maximal

(-1) : niveau minimal

La souche *Lb. brevis* croit normalement sur les deux hydrolysats testés. Cette croissance change considérablement d'un essai à un autre, elle varie de 0.330 à 4.731 sur HAIP et de 1.002 à 5.446 sur HESM (DO 600nm) en fonction des différents paramètres.

Cette grande variation révèle l'effet de la composition du milieu sur la croissance de cette souche, et par conséquent, elle montre l'importance de l'étape d'optimisation afin d'obtenir la meilleure croissance possible.

L'analyse du PPB montre l'influence significative de trois facteurs sur la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP : le glucose, l'extrait de levure et le citrate d'ammonium. Sur HESM seul le glucose a agi significativement sur la croissance.

Tableau 12: Effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HAIP

Facteurs	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		2,0374	0,06589	30,92	0,001
Glucose*	2,4591	1,2295	0,06589	18,66	0,003
Extrait de levure*	- 0,7148	- 0,3574	0,06589	- 5,42	0,032
Citrate d'ammonium *	1,1601	0,5801	0,06589	8,80	0,013
K ₂ HPO ₄	0,0141	0,0070	0,06589	0,11	0,925
MgSO ₄	0,0131	0,0066	0,06589	0,10	0,930
MnSO ₄	0,2411	0,1206	0,06589	1,83	0,209
Tween 80	0,5141	0,2571	0,06589	3,90	0,060
pH	0,1062	0,0531	0,06589	0,81	0,505
Agitation	- 0,4068	- 0,2034	0,06589	- 3,09	0,091

$R^2 = 99.59\%$, R^2 (ajusté) = 97.74%

* Statistiquement significatif à 95%

Résultats & Discussion

Le traitement statistique des résultats de croissance permet de montrer les effets des différents facteurs étudiés, ces effets ainsi que la signification de chaque variable vérifiée par le test de Student « t » sont montrés dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 13: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HESM

Facteurs	Effet	Coef.	ES Coef.	t	p
Constante		2,7373	0,1326	20.65	0,002
Glucose*	2,1930	1,0965	0,1326	8.27	0,014
Extrait de levure	0,8580	0,4290	0,1326	3.24	0,084
Citrate d'ammonium	-0,5847	-0,2923	0,1326	-2,21	0,158
K ₂ HPO ₄	-1,0273	-0,5137	0,1326	-3,87	0,061
MgSO ₄	-0,0320	-0,0160	0,1326	-0,12	0,915
MnSO ₄	0,1673	0,0873	0,1326	0.63	0,592
Tween 80	0,0347	0,0173	0,1326	0.13	0,908
pH	1,0447	0,5223	0,1326	3,94	0,059
Agitation	0,6657	0,3328	0,1326	2,51	0,129

$R^2 = 98,37\%$, R^2 (ajusté) = 91,06%

* Statistiquement significatif à 95%

Les facteurs à effet significatifs sont distingués par des valeurs de $p < 0.05$, leurs effets sont illustrés par les diagrammes de Pareto (figure 8 et 9). La ligne p sépare les facteurs ayant des effets significatifs de ceux à effets non significatifs et les longueurs des barres sont proportionnelles à l'importance des effets des facteurs.

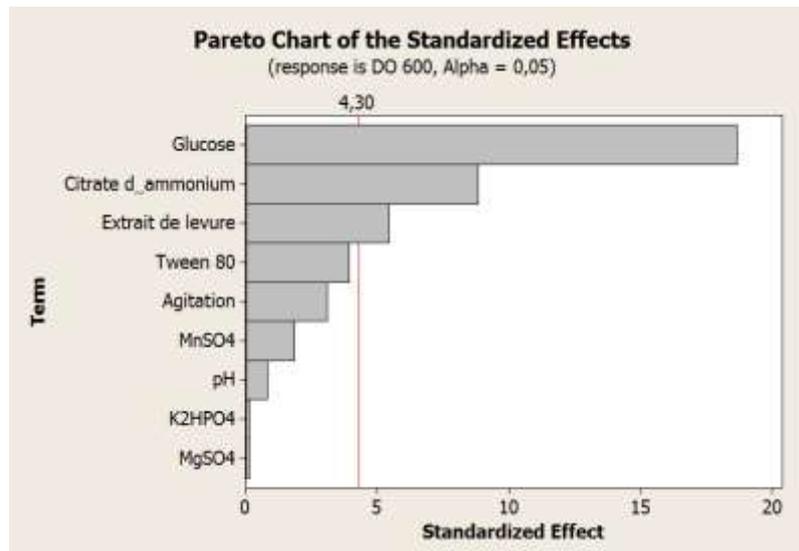


Figure 8: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HAIP

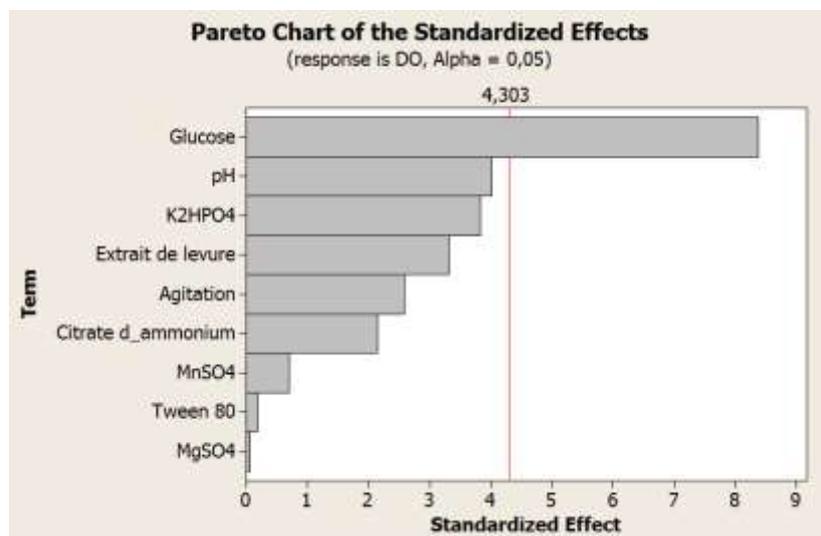


Figure 9: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. brevis* cultivée sur HESM

Le diagramme de Pareto confirme les résultats représentés dans le tableau n°11, en effet, le milieu HAIP n°3 qui présente la D.O (600nm) la plus importante de la souche réunit les conditions d'une croissance optimale prévues lors de l'analyse des résultats du plan. Ce milieu contient le glucose et le citrate d'ammonium à effets positifs et il est dépourvu d'extrait de levure à effet négatif.

Le facteur glucose possède l'impact le plus important sur la croissance de *Lb. brevis* avec des valeurs de p de 0.003 et 0.014 sur le HAIP et le HESM respectivement ($p < 0.05$)

(tableaux 12 et 13). Son effet est significatif et positif et peut être révélé clairement par le tableau 11 qui montre que les milieux contenant du glucose donnent des résultats de croissance significativement supérieurs à ceux obtenus sur des milieux dépourvus de glucose. Le citrate d'ammonium influence significativement ($p=0.013$) et positivement (1.16) la croissance de la souche sur HAIP, alors que l'extrait de levure agit significativement mais négativement sur la croissance de la souche sur HAIP avec un p de 0.032 et un effet de -0.714.

Les autres variables (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $MnSO_4$, Tween 80, pH et agitation) ont montré des valeurs de p supérieurs à 0.05 et sont alors considérés comme facteurs ayant des effets non significatifs sur la croissance au seuil considéré.

Sur HAIP, les trois facteurs à effet significatifs vont définir l'équation modèle de la croissance de *Lb. brevis* comme suit:

$$\hat{Y} = 1,229 X_1 - 0,357 X_2 + 0,580 X_3 + 2,037$$

Sur HESM, les données du tableau 11 montrent que la croissance *Lb. brevis* dépend de la présence ou l'absence du glucose dans le milieu, ainsi on remarque que les milieux qui en contiennent (milieux n° 1, 3, 7, 8, 9 et 11) présentent des valeurs de DO (600 nm) qui dépassent celles des autres milieux. Cet effet positif et significatif du glucose est confirmé par l'analyse du plan (tableau 13) qui lui attribue un effet de +2.193. L'équation est alors en fonction du glucose :

$$\hat{Y} = 1.104 X_1 + 2,7290$$

Vu que le but de l'étude est de maximiser la croissance de la souche, seuls les facteurs ayant un effet « significatif » et « positif » sont sélectionnés pour être optimisés avec le PCC. Les facteurs à effet significatif négatif et ceux à effet non significatif sont alors éliminés.

Comme le pH et l'agitation ne sont pas sélectionnés par le PPB, dans les expériences suivantes le pH des milieux est ajusté à 6.5 comme celui du milieu témoin (MRS) et les cultures sont effectuées dans un incubateur sans agitation.

5.1.2. Optimisation par le PCC

- Pour la croissance sur HAIP, deux facteurs seulement ont été sélectionnés par le PPB, (le glucose et le citrate d'ammonium) et doivent être optimisés par le PCC en testant ceux-ci à cinq niveaux.
- Sur HESM, seule la concentration du glucose doit être optimisée.

5.1.2.1. Optimisation du milieu HAIP

Les concentrations testées et les résultats de croissance obtenus sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Croissance de *Lb. brevis* sur HAIP selon le plan composite central

N° d'essai	Glucose (g/l)	Citrate d'ammonium (g/l)	DO (600 nm)
1	12	0,1	5.28
2	25	0,1	5.38
3	12	0,5	4.80
4	25	0,5	4.91
5	9,3076	0,3	4.96
6	27,6924	0,3	5.36
7	18,5	0,017157	5.44
8	18,5	0,582843	4.80
9	18,5	0,3	6.08
10	18,5	0,3	6.09
11	18,5	0,3	6.07
12	18,5	0,3	6.09
13	18,5	0,3	6.00

La variation des concentrations des facteurs glucose et citrate d'ammonium influe clairement sur la croissance de *Lb. brevis*, cette variation allant de 4.80 à 6.09 confirme les résultats du PPB qui leur attribuent des effets significatifs positifs et montrent l'importance du PCC qui teste les niveaux des facteurs et l'interaction entre eux pour maximiser la croissance. Les résultats d'analyse sont montrés dans le tableau 15.

Tableau 15: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP

	Coef	ES Coef	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante	6.06600	0.02741	221.294	0.000
<i>X</i>	0.09696	0.02167	4.474	0.003
<i>Y</i>	-0.23189	0.02167	-10.701	0.000
<i>X</i> ²	-0.46487	0.02324	-20.004	0.000
<i>Y</i> ²	-0.48488	0.02324	-20.865	0.000
<i>X.Y</i>	0.00250	0.03065	0.082	0.937

X: glucose, *Y*: citrate d'ammonium.

$R^2 = 99.21\%$, R^2 (ajusté) = 98.64%

Le coefficient de détermination (R^2) est estimé à 0.9921, ce qui est proche de 1. Ceci indique la capacité du modèle à expliquer 99.21% des variations et suggère une excellente corrélation entre les valeurs observées et prédites. La valeur élevée du R^2 ajusté (98.64%) indique que le modèle est significatif. La valeur *p* du modèle est inférieure à 0.001, les coefficients linéaires et quadratiques des deux facteurs étudiés sont très significatifs alors que l'interaction entre eux ne l'est pas ($p = 0.937$).

Les figures 10 et 11 présentent la courbe tridimensionnelle et le tracé de son contour qui montrent la variation de la croissance de *Lb. brevis* sur le HAIP en fonction du glucose et du citrate d'ammonium.

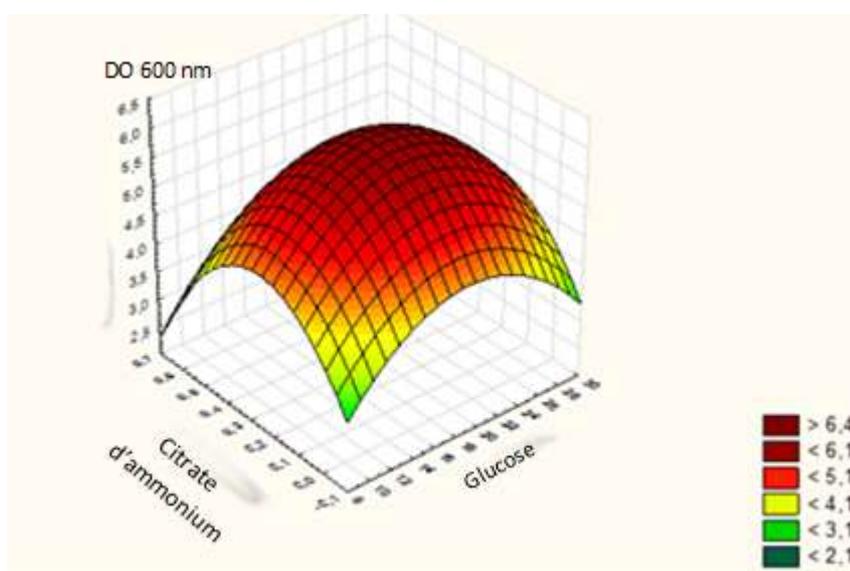


Figure 10: Courbe tridimensionnelle de la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP

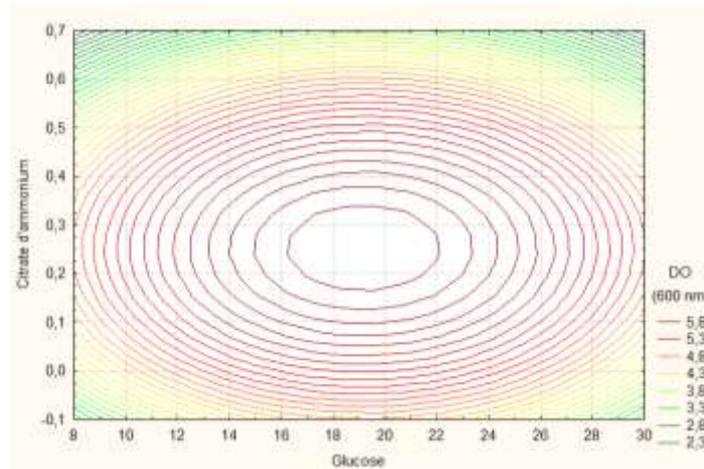


Figure 11: Graphique de contour de la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP

La figure 12 présente le diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. brevis* sur le HAIP, ce diagramme présente l'avantage d'illustrer séparément l'effet des deux facteurs étudiés et de déterminer avec précision les niveaux optimaux des facteurs qui donnent une réponse optimale.

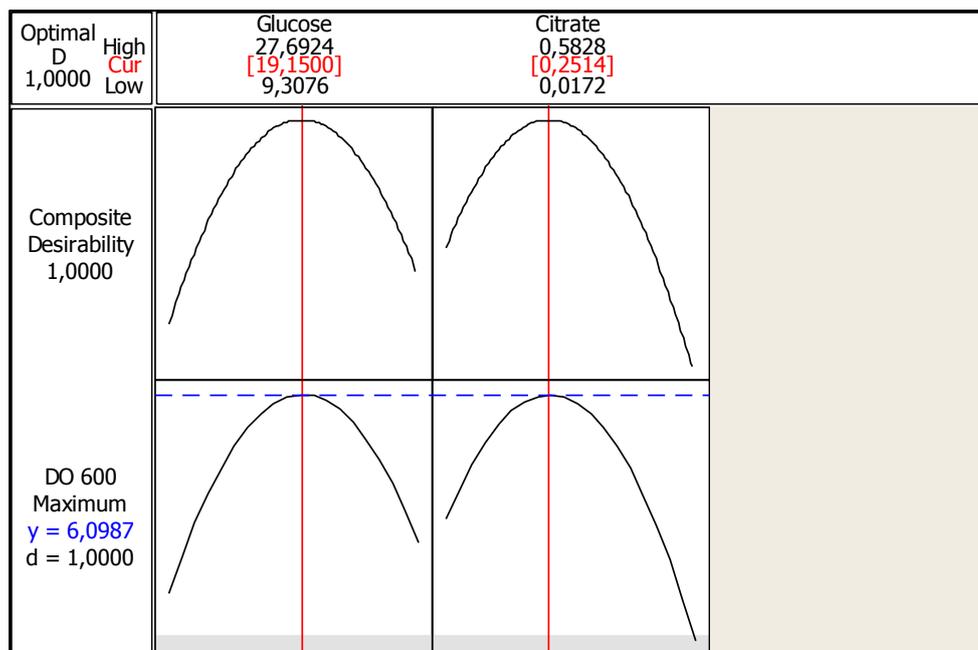


Figure 12: Diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. brevis* sur HAIP

La DO 600 varie en fonction de la concentration en glucose et elle est optimale à une concentration de 19.15 g/L. De même, le citrate d'ammonium influence fortement la croissance; la densité maximale est atteinte à une concentration de 0.25 g/L.

L'équation polynôme du second degré est la suivante :

$$\hat{Y} = 6,066 + 0,096 X - 0,231 Y - 0,464 X^2 - 0,484 Y^2 + 0,002 XY$$

Lorsque *Lb. brevis* est cultivé sur le milieu composé de HAIP et additionné de glucose et de citrate d'ammonium à leurs concentrations optimales, la croissance moyenne de trois essais est estimée à 6.00 (DO 600 nm), celle-ci est proche de la valeur prédite par le modèle 6.09. Ce test après culture confirme les résultats trouvés par le PCC et révèle l'efficacité de ce dernier comme outil d'optimisation.

5.1.2.2. Optimisation du milieu HESM

Le PPD a montré l'influence d'un seul facteur qui est le glucose sur la croissance de *Lb. brevis* sur HESM. Ce facteur a été testé à différentes concentrations variant entre 17 et 22g/L, les résultats de la croissance sont montrés dans la figure 13.

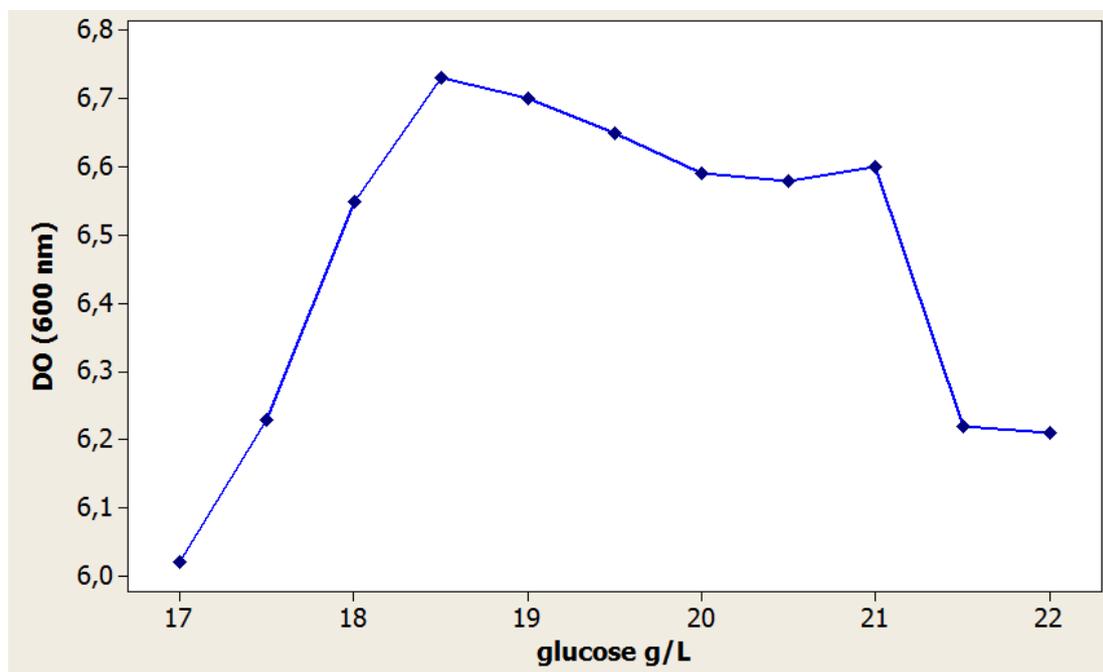


Figure 13: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de *Lb. brevis* sur HESM

Le milieu composé de 18.5 g de glucose par litre de HESM est sélectionné comme milieu optimal pour la croissance de *Lb. brevis* qui atteint une DO de 6.73 après 24h sur ce milieu.

5.2. Milieux pour *Lactobacillus plantarum*

5.2.1. Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB

Tableau 16: Croissance de *Lb. plantarum* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman

<i>N° d'essai</i>	<i>Facteurs</i>											<i>DO (600 nm)</i>	
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>X₃</i>	<i>X₄</i>	<i>(X₅)</i>	<i>X₆</i>	<i>X₇</i>	<i>X₈</i>	<i>X₉</i>	<i>X₁₀</i>	<i>(X₁₁)</i>	HAIP	HESM
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	5.405	5,294
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	1.460	4,440
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	7.250	6,582
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1.264	1,287
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.590	2,919
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	0.935	2,453
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	7.675	3,885
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	5.280	6,582
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	7.875	7,625
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1.000	1,698
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	5.830	5,938
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.745	1,110

(+1) : niveau maximal

(-1) : niveau minimal

Sur les deux hydrolysats, la croissance de *Lb. plantarum* varie de façon importante et semble être fortement influencée par la composition du milieu. Le potentiel de croissance sur les milieux 12 est minimal, ce qui prouve montre la nécessité d’optimiser les hydrolysats en ajoutant d’autres facteurs pour maximiser la croissance de la souche.

Résultats & Discussion

L'analyse des résultats de croissance de la souche *Lb. plantarum* sur HAIP et HESM et que le niveau d'influence de chaque facteur sont présentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivée sur HAIP

Terme	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		3.8591	0,1151	33.52	0,001
Glucose*	5.3868	2.6934	0,1151	23.39	0,002
Extrait de levure	- 0,2902	- 0.1451	0,1151	- 1.26	0,335
Citrate d'ammonium	0.6168	0,3084	0,1151	2.68	0,116
K ₂ HPO ₄	0,4902	- 0.2451	0,1151	- 2.13	0,167
MgSO ₄	0,4115	- 0.2057	0,1151	- 1.79	0,216
MnSO₄*	1.1015	0.5507	0,1151	4.78	0,041
Tween 80	0,3015	0,1508	0,1151	1.31	0,321
pH	- 0.1268	- 0.0634	0,1151	- 0.55	0,637
Agitation	0.4418	- 0,2209	0,1151	1.92	0,195

$R^2 = 99.66\%$, R^2 (ajusté) = 98.15%

* Statistiquement significatif à 95%

Tableau 18: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivée sur HESM

Facteurs	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		4.1511	0,1352	30,71	0,001
Glucose*	3,6665	1,8332	0,1352	13,57	0,005
Extrait de levure	0,6732	0,3366	0,1352	2,49	0,130
Citrate d'ammonium*	1,4318	0,7159	0,1352	5,30	0,034
K ₂ HPO ₄	-0,5515	-0,2758	0,1352	-2,04	0,178
MgSO ₄	1,1212	0,5606	0,1352	4,15	0,054
MnSO ₄	0,4552	0,2276	0,1352	1,68	0,234
Tween 80	-0,6512	-0,3256	0,1352	-2,41	0,138
pH	0,6325	0,3163	0,1352	2,34	0,144
Agitation	-0,3442	-0,1721	0,1352	-1,27	0,331

$R^2 = 99.22\%$, R^2 (ajusté) = 95.72%

* Statistiquement significatif à 95%

Parmi les onze facteurs étudiés, le glucose a significativement influencé la croissance de *Lb. plantarum* sur les deux hydrolysats, le sulfate de manganèse a un effet significatif dans le milieu à base de HAIP, alors que le citrate d'ammonium a agi significativement dans le milieu à base de HESM. Les diagrammes de Pareto montrent les différents effets des facteurs étudiés (figures 14 et 15).

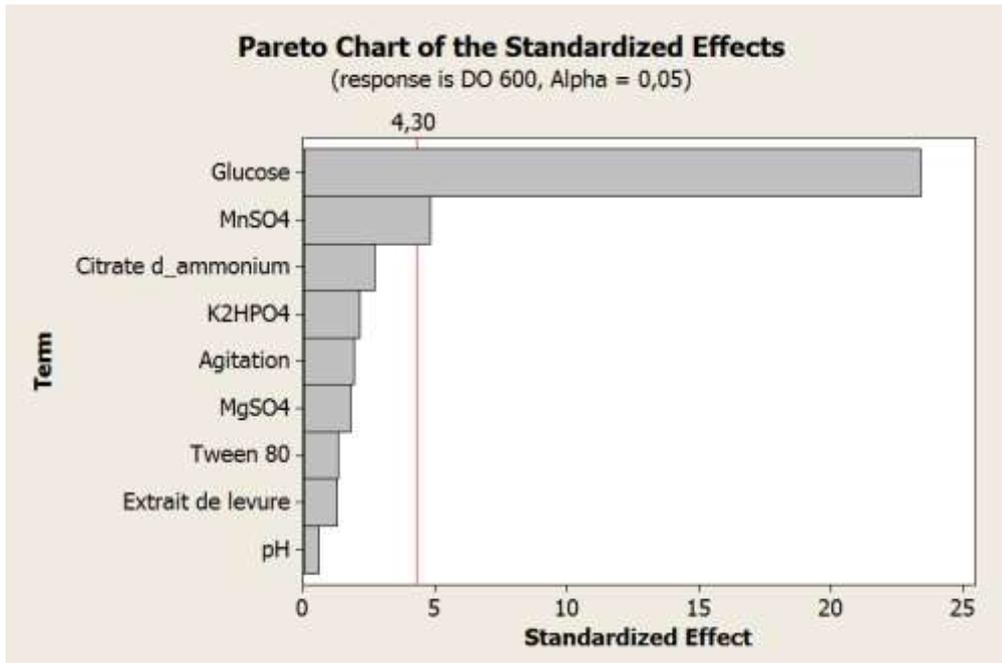


Figure 14: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivé sur HAIP

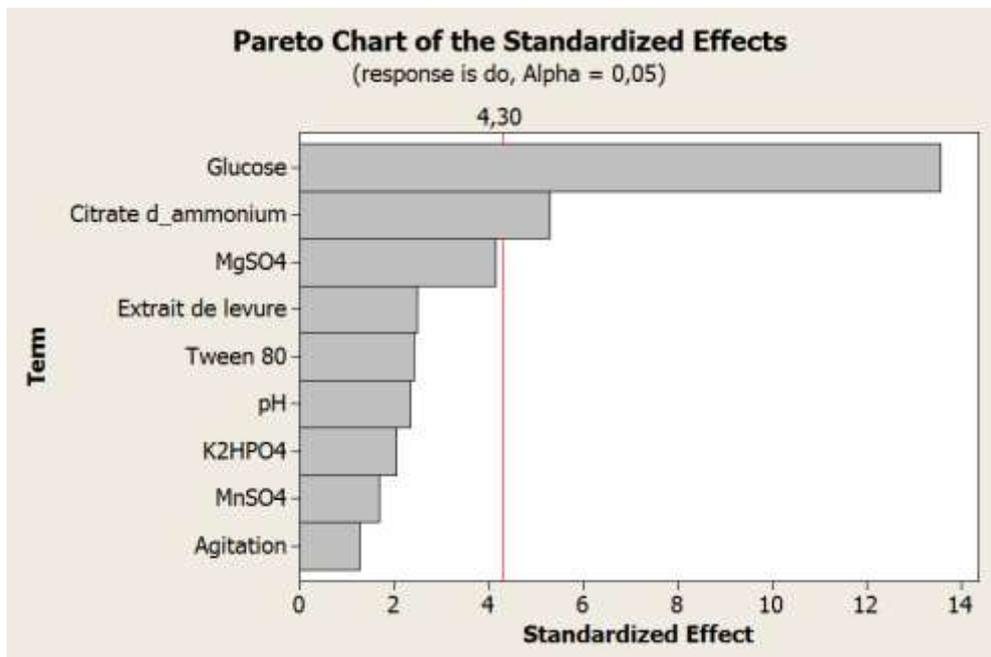


Figure 15: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. plantarum* cultivé sur HESM

Pour les deux hydrolysats, le rôle du glucose semble être très important vu la forte baisse importante de croissance due à son absence, celle-ci atteint seulement 0.745 (DO 600 nm) sur HAIP et 1.110 sur HESM dans le milieu 12. Par contre, les milieux qui en contiennent présentent de bonnes valeurs de DO qui arrivent à 7.87 sur HAIP et 7.625 sur HESM dans le milieu 9 (tableau 16). Cet effet est confirmé par des valeurs de p de 0.002 sur HAIP et de 0.005 sur HESM (<0.05) (tableaux 17 et 18).

Sur HAIP, la croissance de *Lb. plantarum* semble aussi influencée par le facteur $MnSO_4$ (X7) qui exerce un effet significatif ($p = 0.041$) et positif (effet = 1.10), ce sont les cultures n° 3, 7 et 9 qui présentent des DO (600 nm) supérieures à 7. Alors que celles dépourvues de $MnSO_4$ présentent des valeurs de DO (600 nm) moins importantes de l'ordre de 5 (cultures n° 1, 8 et 11).

Le citrate d'ammonium (X3) agit significativement sur la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM avec un p de 0.034, soit une augmentation de 1,431 dûe à sa présence dans le milieu.

L'équation modèle de la croissance de la souche *Lb. plantarum* sur HAIP est influencée par le glucose et le $MnSO_4$:

$$\hat{Y} = 2.693 X_1 + 0.550 X_7 + 3.859$$

L'équation de la croissance sur HESM est la suivante :

$$\hat{Y} = 1,833 X_1 + 0,715 X_3 + 4.151$$

Donc le glucose et le sulfate de manganèse sont retenus pour l'optimisation du HAIP, alors que le HESM sera optimisé en fonction des facteurs glucose et citrate d'ammonium, le reste des facteurs est éliminé.

5.2.2. Optimisation par le PCC

Deux facteurs ont été sélectionnés par le PPB pour la croissance sur HAIP et HESM, ceux-ci sont étudiés par le PCC à cinq niveaux.

Les résultats d'optimisation de la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP et HESM sont montrés dans les tableaux 19 et 20.

Tableau 19: Croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP selon le plan composite central

N° d'essai	Glucose (g/L)	MnSO4 (g/L)	DO (600 nm)
1	12	0,02	5,38
2	25	0,02	7,49
3	12	0,05	5,17
4	25	0,05	7,16
5	9,3076	0,035	4,66
6	27,6924	0,035	6,80
7	18,5	0,0137868	7,83
8	18,5	0,0562132	7,41
9	18,5	0,035	8,06
10	18,5	0,035	7,99
11	18,5	0,035	8,08
12	18,5	0,035	8,08
13	18,5	0,035	8,03

Tableau 20: Croissance de *Lb. plantarum* sur HESM selon le plan composite central

N° d'essai	Glucose (g/L)	Citrate d'ammonium (g/L)	DO (600 nm)
1	12	0,1	6,370
2	25	0,1	6,487
3	12	0,5	7,400
4	25	0,5	6,435
5	9,3076	0,3	6,100
6	27,6924	0,3	5,176
7	18,5	0,017157	6,952
8	18,5	0,582843	7,463
9	18,5	0,3	7,912
10	18,5	0,3	7,880
11	18,5	0,3	7,915
12	18,5	0,3	7,900
13	18,5	0,3	7,931

Les résultats d'analyse de la variance sont montrés dans les deux tableaux suivants :

Tableau 21: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP

	Coef	ES Coef	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante	8,05230	0,11159	72,162	0.000
<i>X</i>	0,89131	0,08822	10,104	0.000
<i>Y</i>	-0,14075	0,08822	-1,595	0.155
<i>X</i> ²	-1,25106	0,09460	-13,224	0.000
<i>Y</i> ²	-0,30806	0,09460	-3,256	0.014
<i>X.Y</i>	-0,03162	0,12476	-0,253	0.807

X: glucose, *Y*: MnSO₄.

$R^2 = 97.58\%$, R^2 (ajusté) = 95.85%

Tableau 22: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM

	Coef	ES Coef	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante	7,9060	0,06783	116,559	0.000
<i>X</i>	-0,2693	0,05362	-5,023	0.000
<i>Y</i>	0,2126	0,05362	3,964	0.005
<i>X</i> ²	-1,0714	0,05750	-18,632	0.000
<i>Y</i> ²	-0,2867	0,05750	-4,985	0.002
<i>X.Y</i>	-0,2705	0,07583	-3,567	0.009

X: glucose, *Y*: citrate d'ammonium.

$R^2 = 98.31\%$, R^2 (ajusté) = 97.10%

Pour le HAIP et le HESM, le R^2 et le R^2 ajusté sont importants ce qui signifie que le modèle est significatif et qu'il peut expliquer presque la totalité des changements des résultats, il signifie aussi que les valeurs trouvées expérimentalement sont proches de celles prédites par le modèle (tableaux 21 et 22).

Les figures 16, 17, 18 et 19 présentent les variations de la densité optique avec la variation des concentrations du glucose et du sulfate de manganèse pour le HAIP, et en fonction de glucose et du citrate d'ammonium pour le HESM.

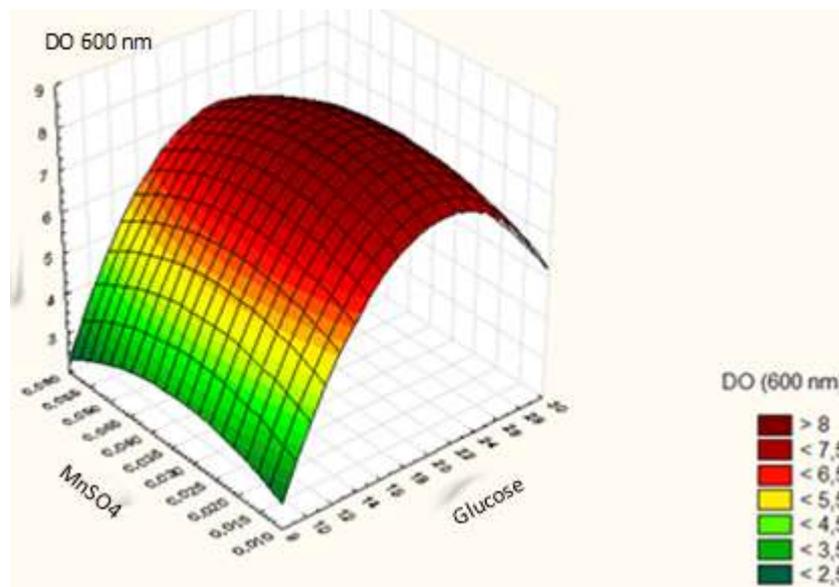


Figure 16: Courbe tridimensionnelle de la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP

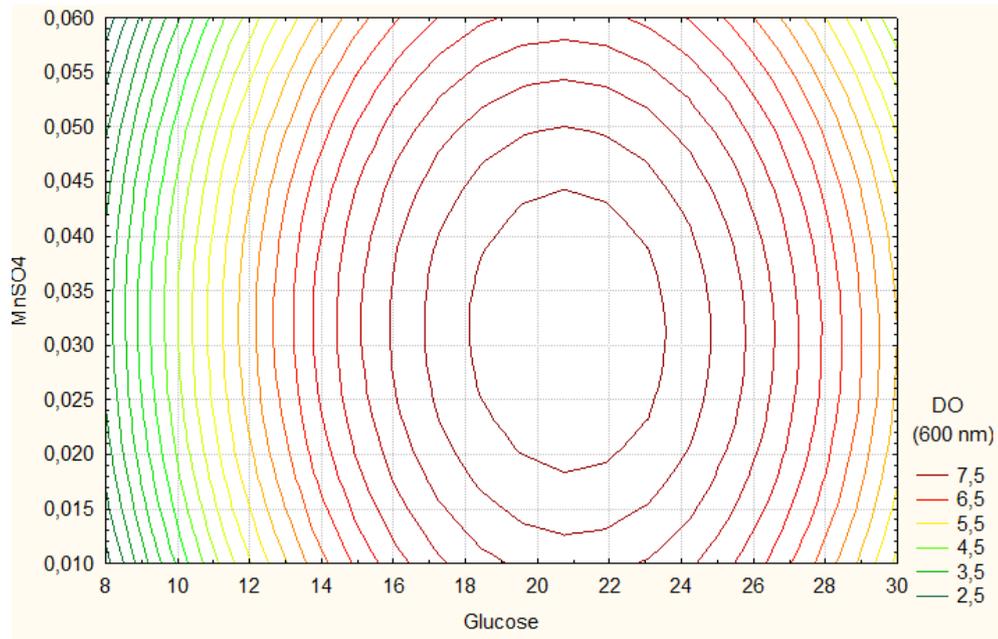


Figure 17: Graphique de contour de la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP

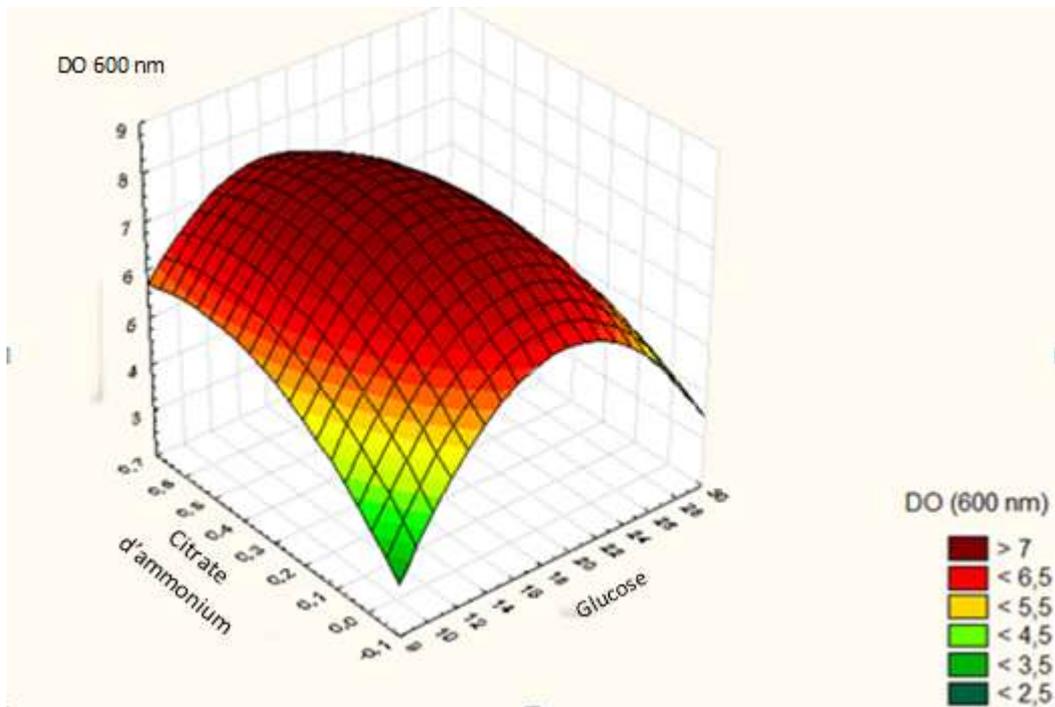


Figure 18: Courbe tridimensionnelle de la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM

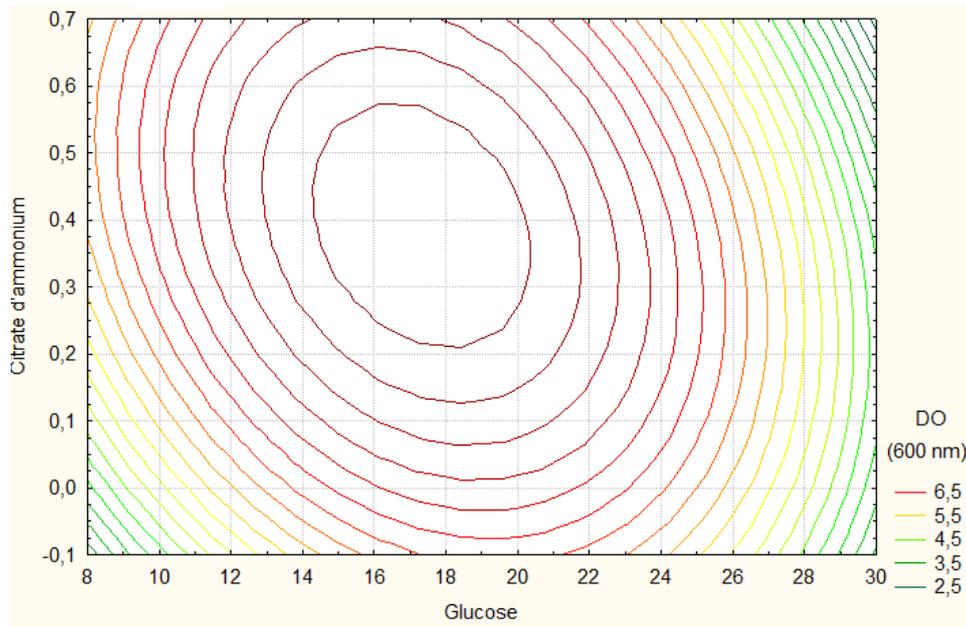


Figure 19: Graphique de contour de la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM

Le diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. plantarum* sur le HAIP (figure 20) montre qu'elle est maximale à une concentration de 20.82 g/L de glucose et 0.03 g/L de sulfate de manganèse.

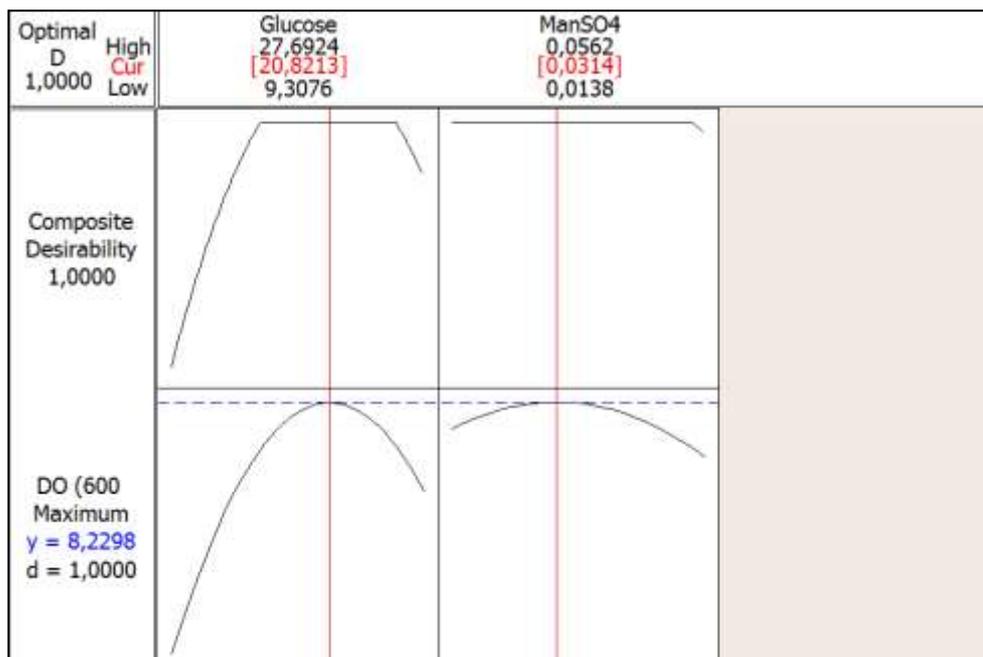


Figure 20: Diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP

L'équation qui décrit la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP en fonction du glucose et du sulfate de manganèse est la suivante :

$$\hat{Y} = -1,251 X^2 - 0,308 Y^2 + 0,891 X - 0,140 Y - 0,031 XY + 8,052$$

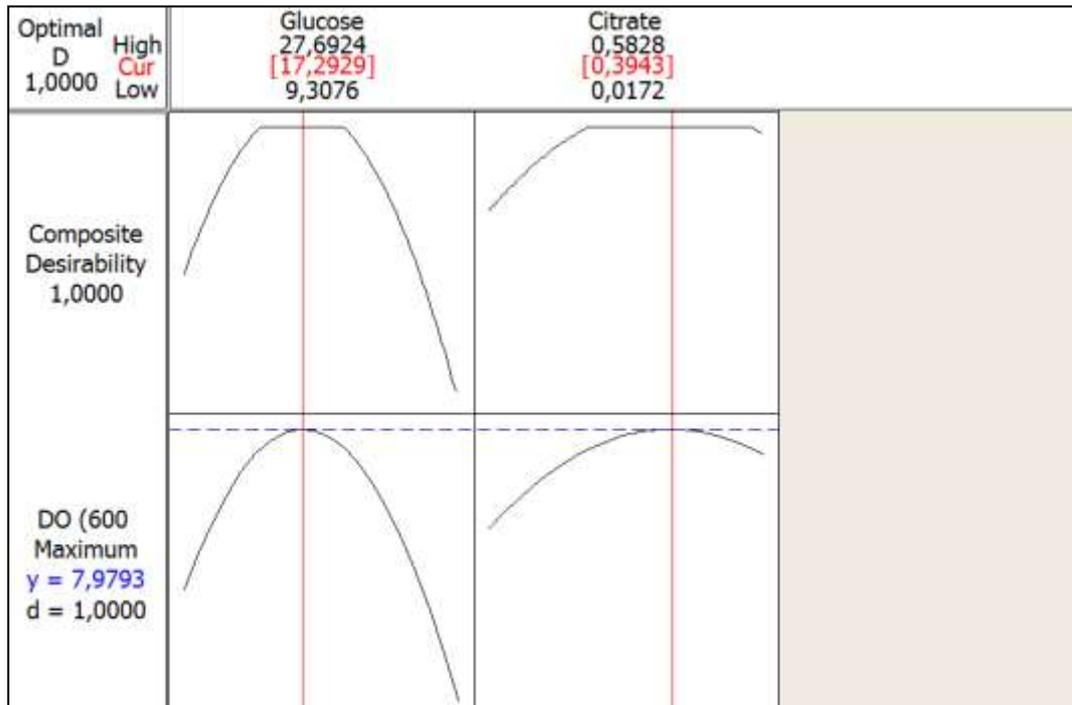


Figure 21: Diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM

Sur HESM, 17.29 g de glucose et 0.39 g de citrate d'ammonium par litre de HESM sont suffisants pour aboutir à une croissance optimale de la souche. L'équation est de la forme :

$$\hat{Y} = -1,0714 X^2 - 0,2867 Y^2 - 0,2693 X + 0,2126 Y - 0,2705 XY + 7,9060$$

Pour la validation des deux modèles, *Lb. plantarum* a étéensemencée sur les milieux optimisés contenant les facteurs à effets significatifs à leur niveaux optimaux. Les résultats de croissance sont estimés à 8.16 et 8.01 sur HAIP et HESM respectivement, ceux-ci sont proches des valeurs prédites qui sont et 8.23 et 7.98 respectivement.

5.3. Milieux pour *Lactobacillus rhamnosus*

5.3.1. Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB

Tableau 23: Croissance de *Lb. rhamnosus* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman

N° d'essai	Facteurs											DO 600 nm	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(X ₅)	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	(X ₁₁)	HAIP	HESM
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	6.505	4,25
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2.420	1,98
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	7.885	7,39
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	2.684	1,83
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	3.050	2,09
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	3.270	1,65
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	7.575	4,42
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	6.180	6,85
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	5.155	5,76
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	2.255	1,58
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	5.765	6,51
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.340	1,19

(+1) : niveau maximal

(-1) : niveau minimal

On remarque que la croissance de *Lb. plantarum* varie sur les douze milieux presque de la même manière pour les deux hydrolysats étudiés, elle atteint des valeurs de DO maximales estimés à 7.88 sur HAIP et à 7.39 sur HESM pour l'essai 3, alors que le milieu 12 composé seulement des hydrolysats sans ajout d'aucun ingrédient a donné des DO minimales

de 1.34 sur HAIP et 1.19 sur HESM. Cette similarité de variation de croissance prévoit une similarité d'exigence de la souche sur les deux hydrolysats.

L'analyse des résultats obtenus par le plan de PB sont montrés dans les tableaux suivants :

Tableau 24: Effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. rhamnosus* cultivé sur HAIP

Facteur	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		4,5070	0,1233	36,55	0,001
Glucose*	4,0077	2,0038	0,1233	16,25	0,004
Extrait de levure	-0,6143	-0,3072	0,1233	-2,49	0,130
Citrate d'ammonium	-0,1707	-0,0853	0,1233	-0,69	0,560
K ₂ HPO ₄	0,4407	0,2203	0,1233	1,79	0,216
MgSO ₄	0,7560	0,3780	0,1233	3,07	0,092
MnSO ₄	0,6490	0,3245	0,1233	2,63	0,119
Tween 80	0,8623	0,4312	0,1233	3,50	0,073
pH	-0,3127	-0,1563	0,1233	-1,27	0,332
Agitation	0,2560	0,1280	0,1233	1,04	0,408

$R^2 = 99.35\%$, R^2 (ajusté) = 96.42%

* Statistiquement significatif à 95%

Tableau 25: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. rhamnosus* cultivée sur HESM

Facteur	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		3,7917	0,1988	19,07	0,003
Glucose*	4,1433	2,0717	0,1988	10,42	0,009
Extrait de levure	-0,1667	-0,0833	0,1988	-0,42	0,716
Citrate d'ammonium	0,8533	0,4267	0,1988	2,15	0,165
K ₂ HPO ₄	0,1533	0,0767	0,1988	0,39	0,737
MgSO ₄	0,4867	0,2433	0,1988	1,22	0,346
MnSO ₄	0,0933	0,0467	0,1988	0,23	0,836
Tween 80	0,4700	0,2350	0,1988	1,18	0,359
pH	0,6467	0,3233	0,1988	1,63	0,245
Agitation	-1,0000	-0,5000	0,1988	-2,51	0,128

$R^2 = 98.43\%$, R^2 (ajusté) = 91.37%

* Statistiquement significatif à 95%

Les variations des DO sont dues essentiellement à la présence ou à l'absence du glucose pour les deux hydrolysats, d'où son effet significatif et positif.

Les effets des neuf facteurs sont montrés dans les figures 22 et 23.

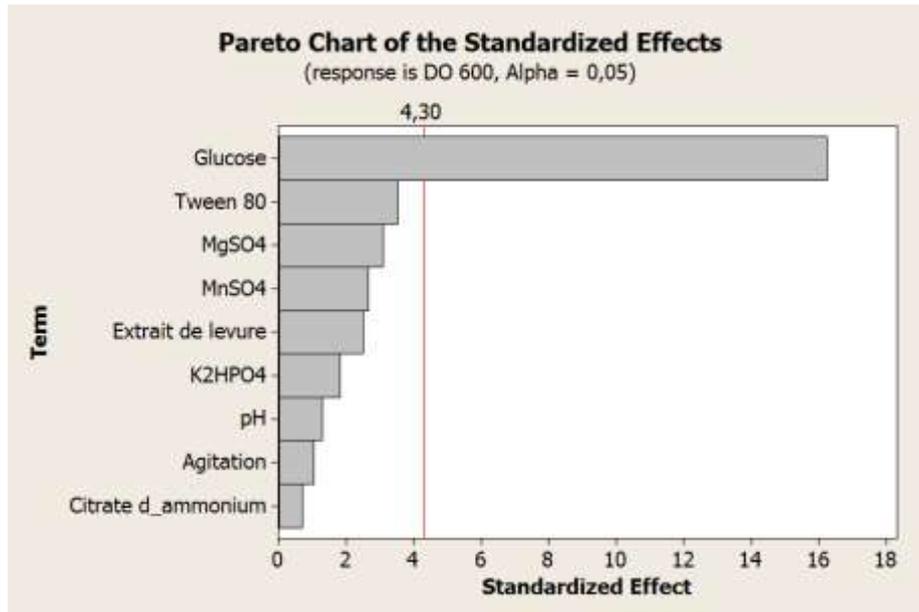


Figure 22: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. rhamnosus* cultivé sur HAIP

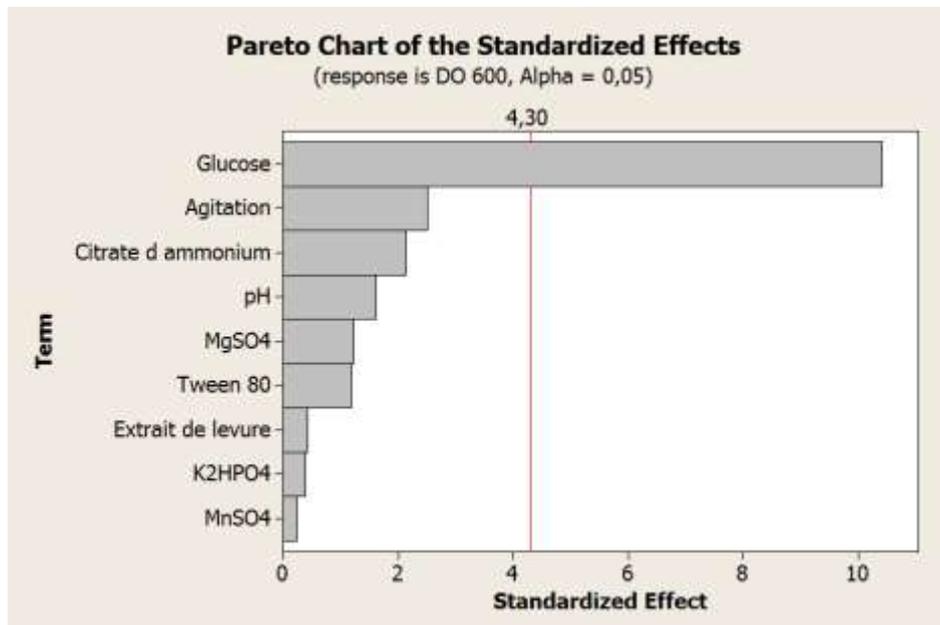


Figure 23: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. rhamnosus* cultivé sur HESM

Les diagrammes de Pareto révèlent une grande importance de l'effet du glucose sur la croissance de *Lb. rhamnosus*, ce facteur est responsable d'une augmentation moyenne de la croissance estimée à 4,00 sur HAIP et 4.14 sur HESM (DO 600 nm) (tableau 24 et 25).

La croissance de *Lb. rhamnosus* en fonction du glucose est calculée comme suit :

- Sur HAIP : $\hat{Y} = 2.003 X_1 + 4.507$
- Sur HESM : $\hat{Y} = 2.071 X_1 + 3.791$

5.3.2. Optimisation des milieux

Les deux hydrolysats ont été additionnés de glucose à différentes concentrations allant de 17 à 22g/L. les résultats de croissance sont présentés dans la figure 24.

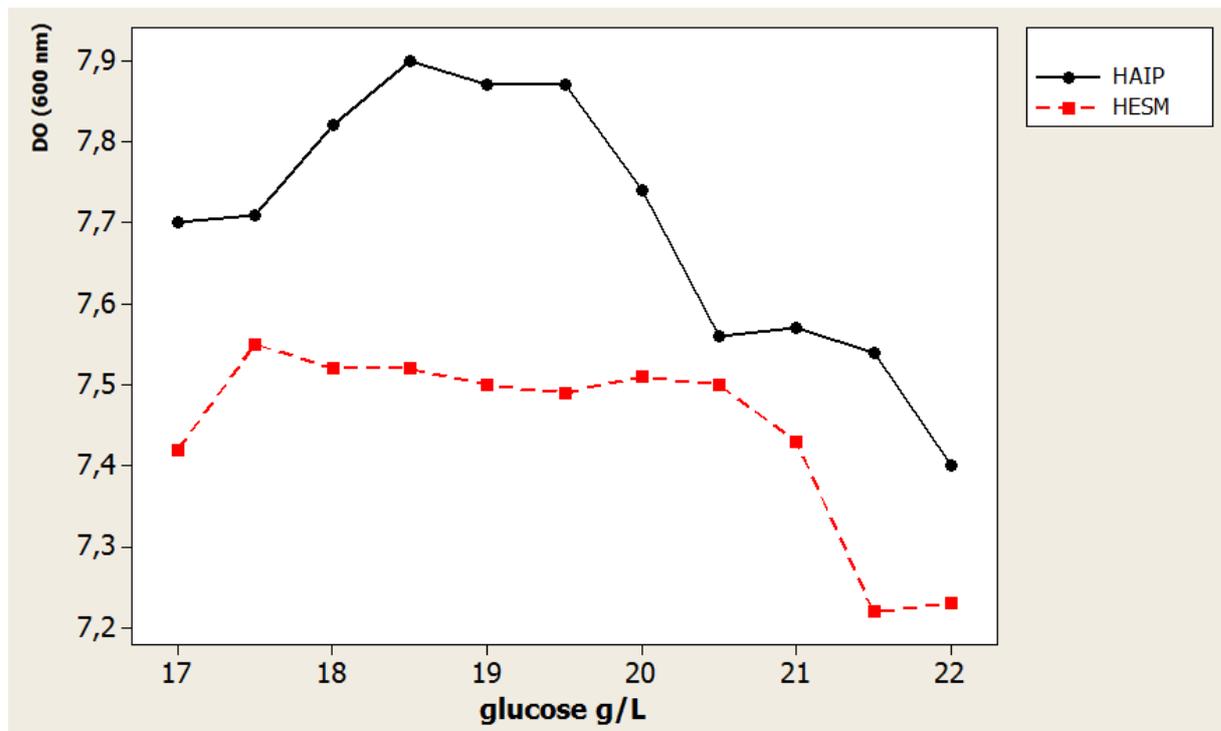


Figure 24: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de *Lb. rhamnosus* sur HAIP et HESM

La croissance de *Lb. rhamnosus* sur les hydrolysats additionnés de glucose a donné des résultats importants, cette croissance atteint son max à des concentrations de glucose de 18.5 et 17.5 sur le HAIP et le HESM respectivement. Ces formulations constituent les milieux optimaux pour la croissance de la souche étudiée.

5.4. Milieux pour *Lactobacillus fermentum*

5.4.1. Sélection des facteurs à effet significatif par le PPB

On note une bonne croissance de la souche étudiée atteignant des DO maximales de 6.63 Sur HESM et 4.15 sur HAIP avec des variations importantes sur les différents milieux formulés à base de HESM par rapport à ceux formulés à base de HAIP (tableau 26).

Tableau 26: Croissance de *Lb. fermentum* sur les différents milieux à base de HAIP et HESM formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman

N° d'essai	Facteurs											DO 600 nm	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(X ₅)	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	(X ₁₁)	HAIP	HESM
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2.80	4,945
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	3.65	1,147
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	4.15	4,774
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1.80	0,553
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.64	0,526
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	1.43	1,521
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	2.31	5,724
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2.36	5,175
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	4.04	6,637
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	3.25	0,918
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	3.87	4,288
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.45	0,445

(+1) : niveau maximal

(-1) : niveau minimal

L'analyse statistique des résultats de croissance est présentée dans les tableaux 27 et 28.

Tableau 27: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. fermentum* cultivée sur HAIP

Facteur	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		2,7292	0,06852	39,83	0,001
Glucose*	1,0517	0,5258	0,06852	7,67	0,017
Extrait de levure	0,5083	0,2542	0,06852	3,71	0,066
Citrate d'ammonium*	1,4083	0,7042	0,06852	10,28	0,009
K ₂ HPO ₄	0,3083	0,1542	0,06852	2,25	0,153
MgSO ₄	-0,1150	-0,0575	0,06852	-0,84	0,490
MnSO ₄	0,3350	0,1675	0,06852	2,44	0,134
Tween 80	-0,2883	-0,1442	0,06852	-2,10	0,170
pH	-0,4117	-0,2058	0,06852	-3,00	0,095
Agitation	-0,3017	-0,1508	0,06852	-2,20	0,159

$R^2 = 99.05\%$, R^2 (ajusté) = 94.77%

* Statistiquement significatif à 95%

Tableau 28: Étude des effets des facteurs testés sur la croissance de *Lb. fermentum* cultivée sur HESM

Facteur	Effet	Coef.	ES Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		3,0544	0,1447	21,11	0,002
Glucose*	4,4055	2,2027	0,1447	15,24	0,004
Extrait de levure	0,3495	0,1748	0,1447	1,21	0,350
Citrate d'ammonium	-0,0122	-0,0061	0,1447	-0,04	0,971
K ₂ HPO ₄	-0,4425	-0,2213	0,1447	-1,53	0,266
MgSO ₄	-0,0795	-0,0398	0,1447	-0,27	0,809
MnSO ₄	0,6765	0,3383	0,1447	2,34	0,144
Tween 80	-0,2188	-0,1094	0,1447	-0,76	0,528
pH	0,1245	0,0623	0,1447	0,43	0,709
Agitation	0,6482	0,3241	0,1447	2,24	0,154

$R^2 = 99.20\%$, R^2 (ajusté) = 95.58%

* Statistiquement significatif à 95%

L'analyse statistique du PPB permet de sélectionner deux facteurs à effet significatif sur la croissance de *L. fermentum* sur HAIP: le citrate d'ammonium et le glucose, avec un effet plus marqué pour le citrate d'ammonium par rapport au glucose.

En effet, le premier présente un effet de 1.40 alors que celui du glucose est de 1.05. Les cultures qui comportent ces deux ingrédients présentent les valeurs de DO les plus importantes (essai n° 3, 9 et 11) (tableau 26).

Sur HESM parmi tous les facteurs étudiés, le glucose uniquement a montré un effet significatif.

Les diagrammes de Pareto illustrent les effets des différents facteurs sur la croissance de la souche sur les deux hydrolysats (figures 25 et 26).

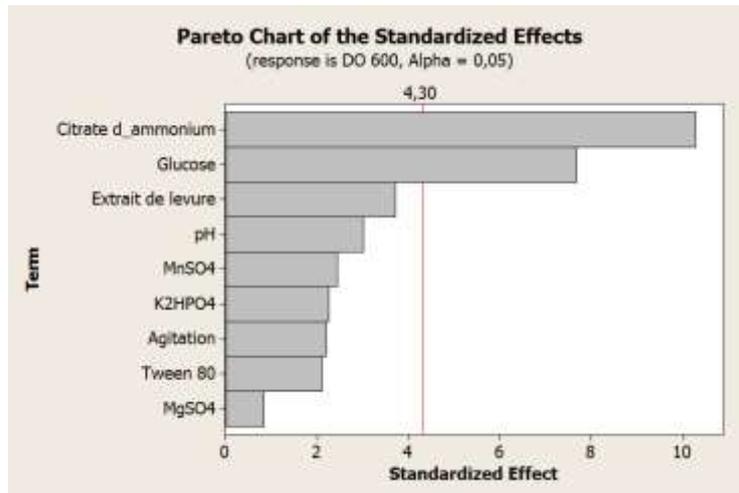


Figure 25: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. fermentum* cultivé sur HAIP

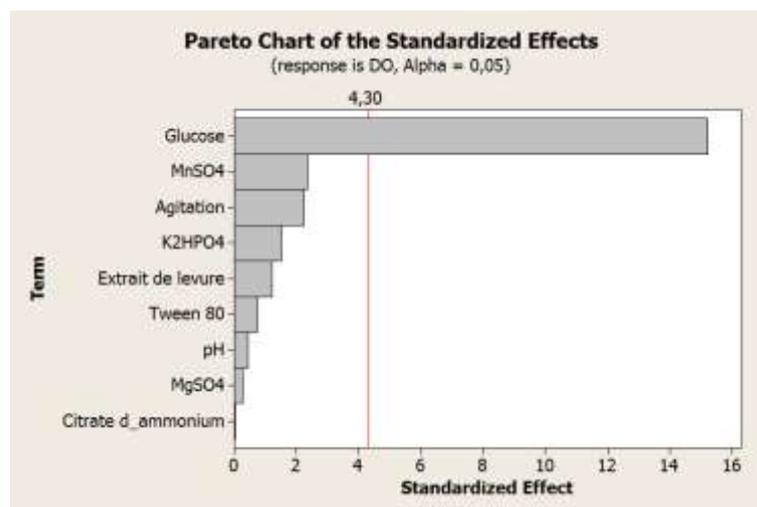


Figure 26: Diagramme de Pareto montrant l'effet des différents paramètres du milieu sur la croissance de *Lb. fermentum* cultivé sur HESM

L'équation suivante exprime la croissance de la souche *L. fermentum* sur HAIP :

$$\hat{Y} = 0,5258 X_1 + 0,7042 X_3 + 2,729$$

La croissance sur HESM est influencée de façon positive et significative par le glucose ($p=0.004$), la croissance de *Lb. fermentum* s'exprime sous la forme :

$$\hat{Y} = 2,2027 X_1 + 3.054$$

Les autres des facteurs présentant des effets non significatifs sont écartés du reste des expériences d'optimisation.

5.4.2. Optimisation des milieux

5.4.2.1. Milieu HAIP

Tableau 29: Résultats de croissance de *Lb. fermentum* sur HAIP selon le plan composite central

N° d'essai	Citrate d'ammonium	Glucose	DO (600 nm)
1	1,50000	12,0000	5,000
2	2,50000	12,0000	5,310
3	1,50000	25,0000	4,890
4	2,50000	25,0000	5,480
5	1,29289	18,5000	5,100
6	2,70711	18,5000	5,670
7	2,00000	9,3076	4,900
8	2,00000	27,6924	4,800
9	2,00000	18,5000	5,504
10	2,00000	18,5000	5,500
11	2,00000	18,5000	5,482
12	2,00000	18,5000	5,480
13	2,00000	18,5000	5,500

L'optimisation des concentrations des deux facteurs (citrate d'ammonium et glucose) en portant leurs valeurs respectives à 2.70g/L et 18.5 g/L a abouti à une croissance exprimée en DO 600 nm de 5.67 (essai 6), alors que sa valeur maximale obtenue par le PPB était de 4.15, ce qui montre l'efficacité du PPC pour l'optimisation d'une réponse étudiée.

L'analyse des résultats est présentée dans le tableau 30.

Tableau 30: Coefficients de régression estimés pour la croissance de *Lb. fermentum* sur HAIP

	Coef	ES Coef	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante	5,49320	0,01333	411,986	0.000
<i>X</i>	0,17826	0,01054	16,911	0.000
<i>Y</i>	-0,04518	0,01054	-4,286	0.004
<i>X</i> ²	-0,05848	0,01130	-5,173	0.001
<i>Y</i> ²	-0,32598	0,01130	-28,837	0.000
<i>X.Y</i>	0,00000	0,01491	0,000	1.000

X: citrate d'ammonium, *Y*: glucose

$R^2 = 99.39\%$, R^2 (ajusté) = 98.95%

Le coefficient de détermination R^2 est proche de 1; ceci indique la capacité du modèle à expliquer la variabilité des données. La valeur de *p* du modèle était inférieure à 0.001 indiquant la fiabilité du modèle. Pour les facteurs expérimentaux, les coefficients linéaires et quadratiques sont très significatifs. L'équation du polynôme du second degré est la suivante :

$$\hat{Y} = -0,058 X^2 - 0,325 Y^2 + 0,178 X - 0,045 Y + 5,493$$

La valeur *p* de l'interaction entre eux dépasse 0.05 et son coefficient est estimé à 0.00, elle est donc jugée comme non significative.

Les variations des valeurs de DO en fonction du citrate d'ammonium et du glucose sont montrées par la courbe tridimensionnelle et le graphique de contour (figures 27 et 28).

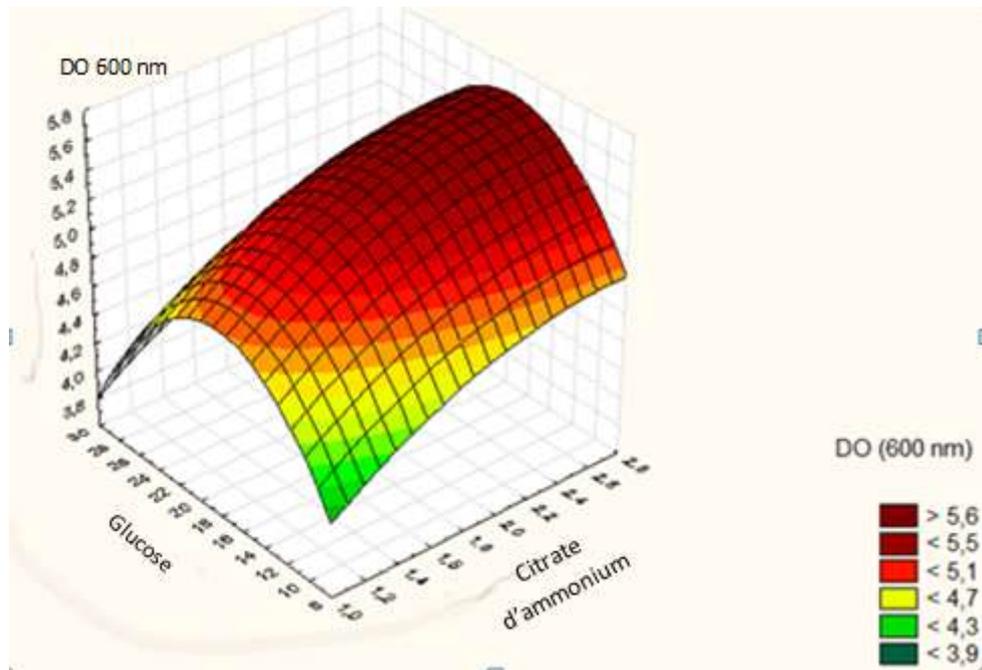


Figure 27: Courbe tridimensionnelle de la croissance de *Lb. fermentum* sur HAIP

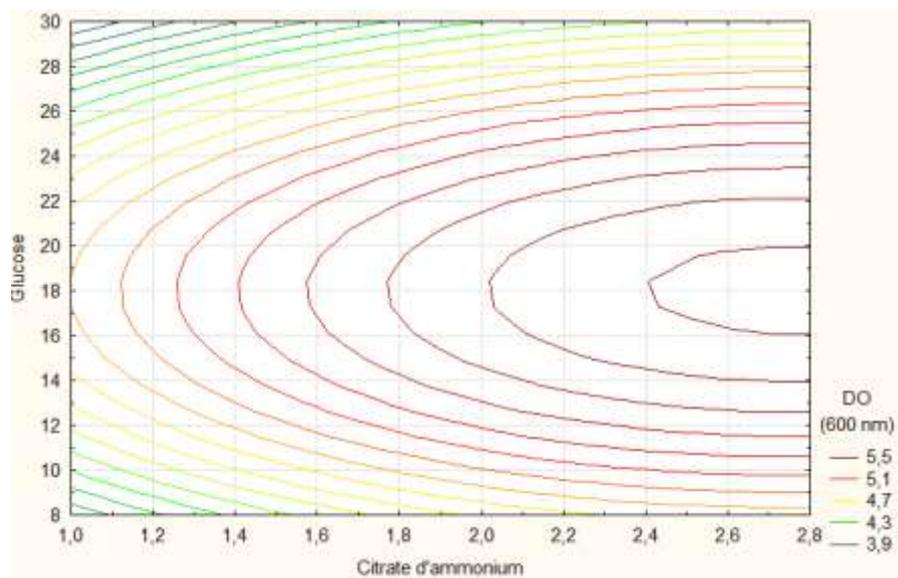


Figure 28: Graphique de contour de la croissance de *Lb. fermentum* sur HAIP

La figure 29 présente le diagramme d'optimisation qui éclaircie cette variation et détermine les valeurs optimales des facteurs étudiés.

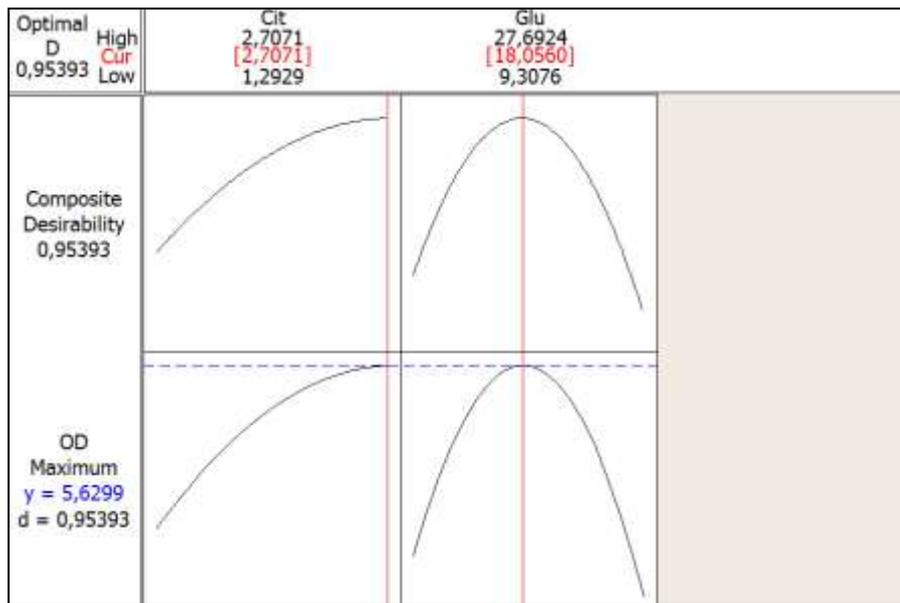


Figure 29: Diagramme d'optimisation de la croissance de *Lb. fermentum* sur HAIP

D'après le diagramme d'optimisation basé sur l'équation citée, la croissance est maximale dans un milieu à base de HAIP contenant 2.70 g/L de citrate d'ammonium et de 18.05 g/L de glucose.

La validation du modèle réalisée en cultivant la souche sur le milieu optimisé a montré un résultat de croissance de 5.59, ce qui est proche de la valeur prédite par le modèle (5.62). Cette concordance entre la valeur prédite et la valeur observée valide encore le modèle.

5.4.2.2. Milieu HESM

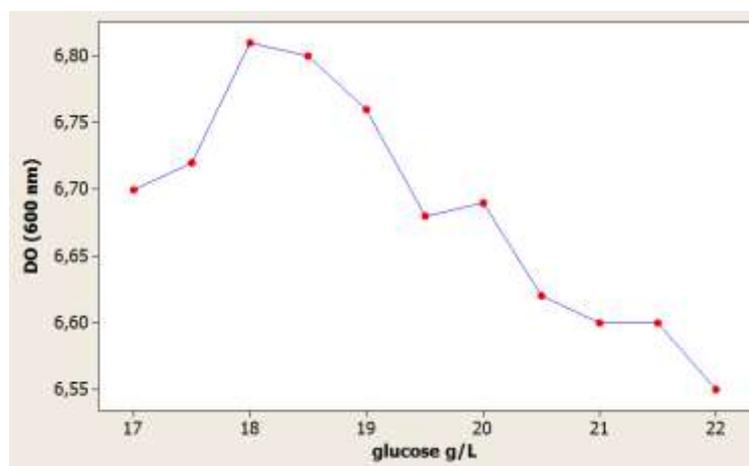


Figure 30: Optimisation de la concentration de glucose pour la croissance de *Lb. fermentum* sur HESM

La variation de la concentration de glucose entre 17 et 22 g/L a montré que la croissance optimale de 6.81 (DO 600nm) est atteinte à une concentration de 18 g/L de glucose, et qu'elle diminue de part et d'autre de cette valeur (figure 30).

6. Cinétiques de croissance sur les milieux optimisés par comparaison au milieu témoin MRS

Les cinétiques de croissance des quatre souches cultivées sur leurs milieux optimisés respectifs à base de HAIP et HESM et sur le milieu commercial MRS comme témoin sont représentées dans les figures 31, 32, 33 et 34. Les croissances optimales observées sont présentés dans le tableau 31. Il en ressort que la croissance des quatre lactobacilles sur les milieux optimisés à base de HAIP et HESM passe par une phase de latence courte et presque semblable à celle observée sur le milieu MRS.

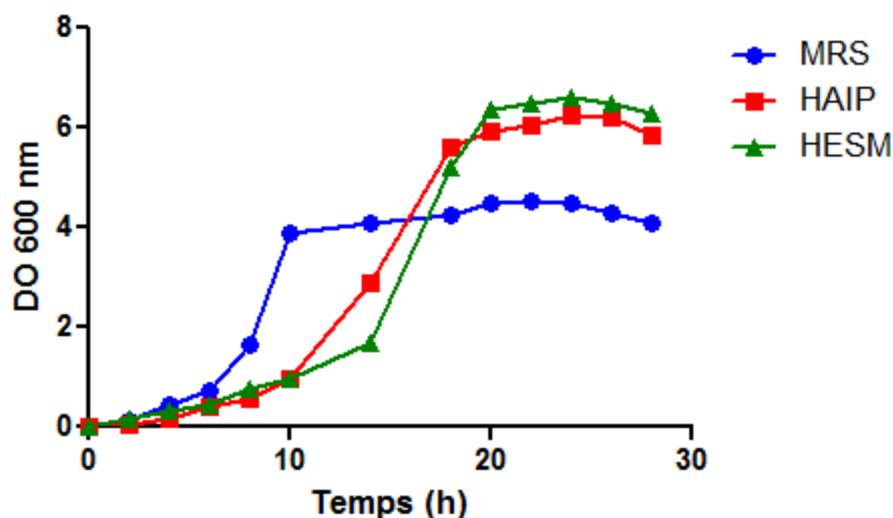


Figure 31: Cinétique de croissance de *Lb. brevis* sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS

La croissance de *Lb. brevis* sur les milieux HAIP et HESM optimisés est plus importante mais moins rapide et décalée dans le temps par rapport à celle obtenue sur le milieu témoin MRS sur lequel la phase stationnaire est relativement plus longue (fig. 31). La croissance maximale est observée sur HESM (tableau 31). Celle-ci dépasse celles obtenues sur HAIP de 4.3% et celle sur MRS de 54%.

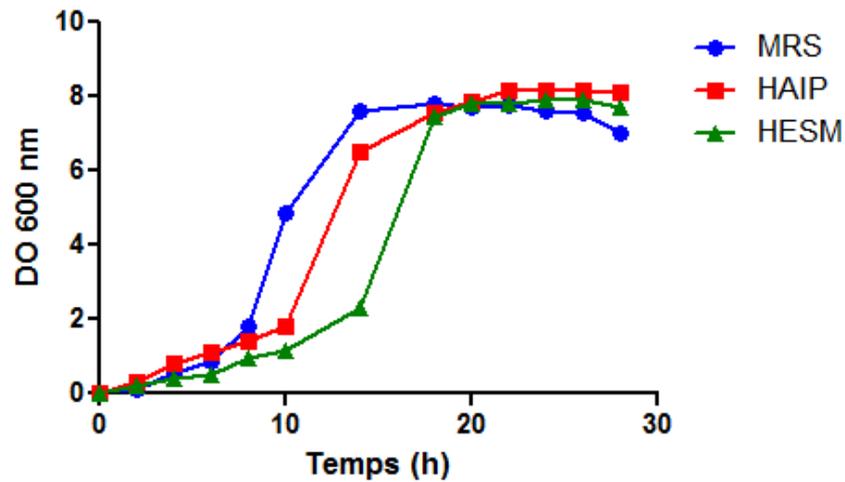


Figure 32: Cinétique de croissance de *Lb. plantarum* sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS

La croissance de *Lb. plantarum* est plus rapide sur MRS, elle atteint son niveau maximal après environ 13h alors que sur HAIP et HESM cette croissance maximale est observée après 16h et 22h respectivement (fig.32). Le tableau 31 révèle que la croissance optimale est de 8.17 (DO 600 m) et est obtenue sur HAIP, celle-ci dépasse légèrement celles obtenues sur HESM et MRS de 3.4% et 4.3% respectivement.

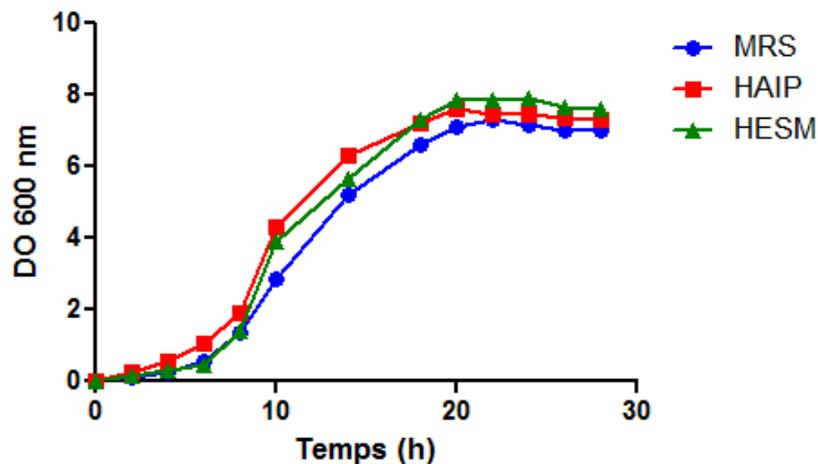


Figure 33: Cinétique de croissance de *Lb. rhamnosus* sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS

Pour *Lb. rhamnosus*, l'évolution des courbes de croissance sur les trois milieux est presque similaire (fig.33) et le maximum de croissance est de 7.9 (DO 600 nm) et est obtenu sur le milieu HESM, les valeurs maximales obtenues sur HAIP et MRS sont 7.59 et 7.32 (DO 600 nm) respectivement.

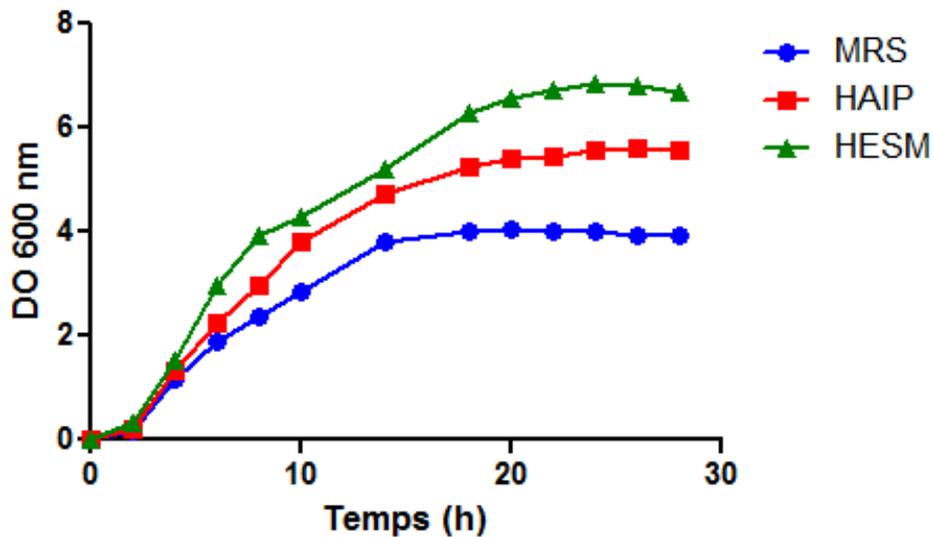


Figure 34: Cinétiques de croissance de *Lb. fermentum* sur les milieux HAIP et HESM optimisés et sur MRS

Lb. fermentum a montré des courbes de croissance comparables et qui évoluent de la même manière (fig. 34). Cependant, le HESM semble beaucoup plus efficace que le HAIP et le MRS pour la croissance de cette souche, celle-ci dépasse celles observées sur HESM et MRS de 21.7% et 69.7 % respectivement (tableau 31).

Tableau 31: croissances optimales observée des quatre lactobacilles sur HAIP, HESM et MRS témoin

Croissance optimale DO (600 nm)			
Souches	Milieux		
	Sur MRS	Sur HAIP	Sur HESM
<i>Lb. brevis</i>	4.28	6.23	6.59
<i>Lb. plantarum</i>	7.83	8.17	7.90
<i>Lb. rhamnosus</i>	7.32	7.5	7.90
<i>Lb. fermentum</i>	4.03	5.62	6.84

Le tableau 32 représente les valeurs des vitesses spécifiques des quatre souches cultivées sur leurs milieux optimisés respectifs et sur milieu MRS.

Les trois souches : *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. fermentum* présentent des vitesses spécifiques de croissance importantes sur HESM par rapport aux deux autres milieux. Pour la souche *Lb. plantarum*, la croissance semble être plus rapide sur HAIP suivie par celle sur HESM et puis celle sur MRS.

Tableau 32: Vitesses spécifiques de croissance des quatre souches sur les milieux : MRS, HAIP et HESM

$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$				
Souches Milieux	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. fermentum</i>
MRS	0.428	0.497	0.371	0.238
HAIP	0.334	0.641	0.409	0.263
HESM	0.569	0.582	0.517	0.328

7. Estimation des coûts de production

7.1. Estimation des coûts de production des hydrolysats

Les coûts de production des quatre hydrolysats sont faibles, ceux à base d'intestins de poulet sont les moins chers, ceux-ci sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 33: Estimation approximative du coût de production d'un litre de chaque hydrolysats (DA)

Prix de revient/L d'hydrolysats (DA)				
Milieux \ Intrants	HAIP	HEIP	HCSM	HESM
Substrat	0,00	0,00	0,00	0,00
Papaine	0,00	80,44	0,00	80,44
HCL/ NaOH	37,56	≈ 0,00	37,56	≈ 0,00
Energie	25,07	100,29	100,29	100,29
Eau	0,007	0,007	0,007	0,007
Total	62,63	180,73	137,85	180,73

7.2. Estimation du prix d'un litre du milieu MRS synthétisé

Tableau 34: Estimation approximative du coût de production d'un litre de milieu MRS

Ingrédient	Quantité (g)/volume utilisé (ml)	Prix (€)	Prix (DA)
Eau distillée (ml)	1000	0,37	50,36
Glucose (g)	20	2,36	321,21
Extrait de levure (g)	5	1,32	179,66
Citrate d'ammonium (g)	2	0,674	91,73
K ₂ HPO ₄ (g)	2	0,14	19,38
MgSO ₄ (g)	0,2	0,04	5,77
MnSO ₄ (g)	0,05	0,02	3,266
Tween 80 (ml)	1	0,09	13,47
Extrait de viande (g)	10	3,4	462,77
Peptone (g)	10	3,34	454,60
Prix de revient		11,77	1602,25

7.3. Estimation des coûts de production des milieux optimisés

Pour les milieux optimisés, les coûts des composants à ajouter (glucose, MnSo₄, citrate d'ammonium) ont été additionnés au coût de chaque hydrolysats.

L'augmentation du prix des milieux finaux optimisés pour toutes les souches est due essentiellement au prix du glucose, celui-ci constitue environ 85% du coût des milieux à base de HAIP et 60% des milieux à base de HESM.

Les prix des milieux nouvellement synthétisés sont 3 à 4 fois moins chers que le milieu commercial MRS réalisant un bénéfice allant de 1271,32 à 1415,42 DA par litre.

Tableau 35: Estimation approximative du coût de production d'un litre de milieu optimisé pour les différentes souches et bénéfice réalisé par rapport au prix d'un litre de MRS (DA)

Souches	Milieux à base HAIP		Milieux à base HESM	
	PR	BR/L	PR	BR/L
<i>Lb. brevis</i>	345,33	1403,84	477,85	1271,32
<i>Lb. plantarum</i>	371,98	1377,19	460,21	1288,96
<i>Lb. rhamnosus</i>	333,75	1415,42	461,79	1287,38
<i>Lb. fermentum</i>	338,91	1410,26	469,82	1279,35

PR : prix de revient, BR : bénéfice réalisé

Discussion

Les conditions d'hydrolyse affectent directement les propriétés du produit final ; son aspect (Kristinsson et Rasco, 2000), sa qualité (He *et al.*, 2015 ; Venuste *et al.*, 2013) son degré d'hydrolyse (Gbogouri *et al.*, 2004) et par conséquent, sa capacité à supporter la croissance des bactéries (Safari *et al.*, 2012).

L'aspect des quatre hydrolysats étudiés varie avec la variation du degré d'hydrolyse. En effet, la clarté des hydrolysats dépend du poids moléculaire des fractions peptidiques présentes ainsi que la présence de particules non solubles qui peuvent donner un aspect sombre et colloïdal, ce qui signifie que le degré d'hydrolyse définit par le contenu du produit final influe automatiquement sur l'aspect des hydrolysats.

La croissance de *Lb. plantarum* sur les différents hydrolysats est importante, ceci est probablement dû à la richesse des différents hydrolysats en éléments nutritifs.

Pour la pâte d'intestins, les résultats de croissance sur HAIP produit par autolyse des intestins sont meilleurs et dépassent ceux obtenus sur l'hydrolysate papainique (HEIP), car le produit final d'une autolyse est généralement riche en acides aminés libres et en petits peptides (Kristinsson et Rasco, 2000). Ce résultat corrobore celui trouvé par Vazquez *et al.*, (2004) qui ont utilisé les viscères de poissons hydrolysés avec les enzymes endogènes à pH neutre pour la croissance des bactéries lactiques, ils ont supposé que les bactéries lactiques pourraient maintenir un consortium stable dans l'espace intestinal en raison de la disponibilité des fractions peptidiques produites par les enzymes protéolytiques de la région digestive. Ils ont conclu que les autolysats des homogénats de viscères pourraient produire des fragments peptidiques (peptones) appropriés à la culture des bactéries lactiques.

L'efficacité de la méthode autolytique pour la pâte d'intestins confirme le résultat trouvé par (Jamdar et Harikumar, 2005) qui a déclaré que les protéines intestinales de poulet pourraient être dégradées de manière exhaustive par les enzymes endogènes acides de l'intestin. Ces enzymes sont essentiellement des cathepsines, des protéases alcalines et des aminopeptidases : Phénylalanine-Arginine aminopeptidase, Proline aminopeptidase, Tyrosine aminopeptidase, Alanine aminopeptidase et Leucine aminopeptidase (Mane *et al.*, 2011). Le pH acide favorise l'action des protéases intracellulaires et surtout les cathepsines D et E (Jamdar et Harikumar, 2005).

La croissance de *Lb. plantarum* sur HCSM produit par hydrolyse chimique acide à chaud a donné un bon résultat de croissance. Dans une étude similaire sur les cornes de mouton, Kurbanoglu *et al.*, (2004) affirment que les peptones issus de ces cornes hydrolysés à pH 3 supportent efficacement la croissance de *Lactobacillus casei*. Cependant la croissance sur l'hydrolysate enzymatique (HESM) est meilleure car il présente le degré d'hydrolyse le plus fort.

Le choix de la méthode d'hydrolyse ne repose pas seulement sur le degré d'hydrolyse et les résultats de croissance, mais aussi sur le coût du processus réalisé. En effet, un processus d'hydrolyse doit assurer un meilleur rendement, une faible demande en énergie et une utilisation efficace d'enzymes, ce qui entraîne directement la baisse du coût (Sauvageon, 2012).

Les résultats de croissance sur les hydrolysats à base de farine de sabots sont nettement meilleurs sur HESM, ce qui nous a conduits à préférer l'hydrolyse enzymatique malgré son coût à l'hydrolyse acide.

Mais dans le cas des hydrolysats de la pâte d'intestins, les résultats obtenus sont très proches, nous avons donc choisi la méthode autolytique qui présente le moindre coût.

Le plan de Plackett et Burman a permis un criblage facile et rapide des neuf variables étudiés. Les quatre souches étudiées ont montré un fort besoin en glucose sur les deux types d'hydrolysats.

La baisse des valeurs de DO (600 nm) due à l'absence du glucose dans les milieux, couplée au haut niveau de confiance des résultats statistiques prouve d'une part l'importance de cet ingrédient pour la croissance des lactobacilles et d'autre part la carence du HAIP et du HESM en ce sucre mis en évidence lors du dosage des sucres totaux. En effet, les glucides constituent la principale source de carbone et d'énergie pour les bactéries lactiques pour une croissance et une fonctionnalité normales (Wright et Axelsson, 2011) et le glucose est le sucre préféré par un grand nombre de souches lactiques (Kim *et al.*, 2009). Ce résultat corrobore celui trouvé par Berecka *et al.*, (2010) qui ont optimisé un milieu de culture pour la croissance de *Lb. rhamnosus* et après criblage des facteurs avec le PPD, le glucose a été retenu car il a influencé positivement la croissance de la souche étudiée. Teusink *et al.*, (2006) a aussi affirmé que l'ajout du glucose dans le milieu conduit à une amélioration de la production de biomasse de *Lb. plantarum*.

Le deuxième facteur qui a montré une importance dans les milieux formulés est le citrate d'ammonium. Il a exercé un effet significatif et positif sur la croissance de *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* sur HAIP, et sur la croissance de *Lb. plantarum* sur HESM.

Les bactéries lactiques sont connues pour consommer le citrate en présence du glucose (Kim *et al.*, 2009), d'après la littérature, plusieurs avantages ont été attribués à l'ajout de cet ingrédient dans le milieu. En plus d'être un agent tampon dans le milieu (Hayek et Ibrahim, 2013), Goffin *et al.*, ont étudié la croissance de *Lb. plantarum* sur un milieu qui contient le glucose et le citrate comme sources de carbone et déclarent que ce dernier est converti avec le glucose en lactate, acétate, éthanol, succinate et formiate pour produire de l'énergie. Il est aussi considéré comme une source inorganique d'azote et favorise la croissance de *Lactobacillus bifementans* selon Givry (2006).

L'extrait de levure est connu pour être une source d'azote complexe utilisée comme supplément dans la majorité des processus de fermentation et améliore la croissance des bactéries lactiques Horn *et al.*, (2005).

Son importance est due aux bases purines et pyrimidines et aux vitamines de classe B qu'il contient (Amrane et Prignint, 1994). Dans les milieux que nous avons testé ces facteurs de croissance semblent être apportés par les hydrolysats eux-mêmes, ce qui rend cet ingrédient inutilisable voir même inhibiteur dans le cas de *Lb. brevis*.

Le tween 80 qui est un mélange d'esters oléiques et une source d'acide gras, accélère la croissance bactérienne (Lee *et al.*, 1997), il agit positivement sur la production d'acide lactique, (Naveena *et al.*, 2005) et son apport peut supprimer le besoin des bactéries lactiques en biotine (Ledesma *et al.*, 1977). Mais dans notre étude, le Tween 80 présente toujours un effet non- significatif, ce résultat est en accord avec celui de Gao *et al.*, (2009) qui ont indiqué que le Tween 80 n'est pas exigé par *Lb. fermentum* mais il oppose celui trouvé par Hanoune *et al.*, (2015) qui affirme qu'il influe significativement sur la croissance de la même espèce.

L'effet du K_2HPO_4 apparaît non significatif, ce résultat est confirmé par celui trouvé par Zhang *et al.*, (2014) qui ont indiqué que le K_2HPO_4 n'a aucun effet significatif sur la croissance du *Lb. rhamnosus*. Aussi, Kassas *et al.*, (2015) indiquent que ce sel n'a pas d'effet sur la croissance de certaines lactobacilles développés sur l'association lupin et lactosérum comme milieu.

La non significativité de l'effet du MgSO₄ sur la croissance des souches est appuyée par les résultats trouvés par Hanoune *et al.*, (2015) et Zhang *et al.*, (2014) qui ne lui attribuent aucun effet sur la croissance des souches *Lb. fermentum* et *Lb. rhamnosus* respectivement. Alors que Kassas *et al.*, (2015) ont montré que le MgSO₄ influence positivement la croissance de *Lb. plantarum*.

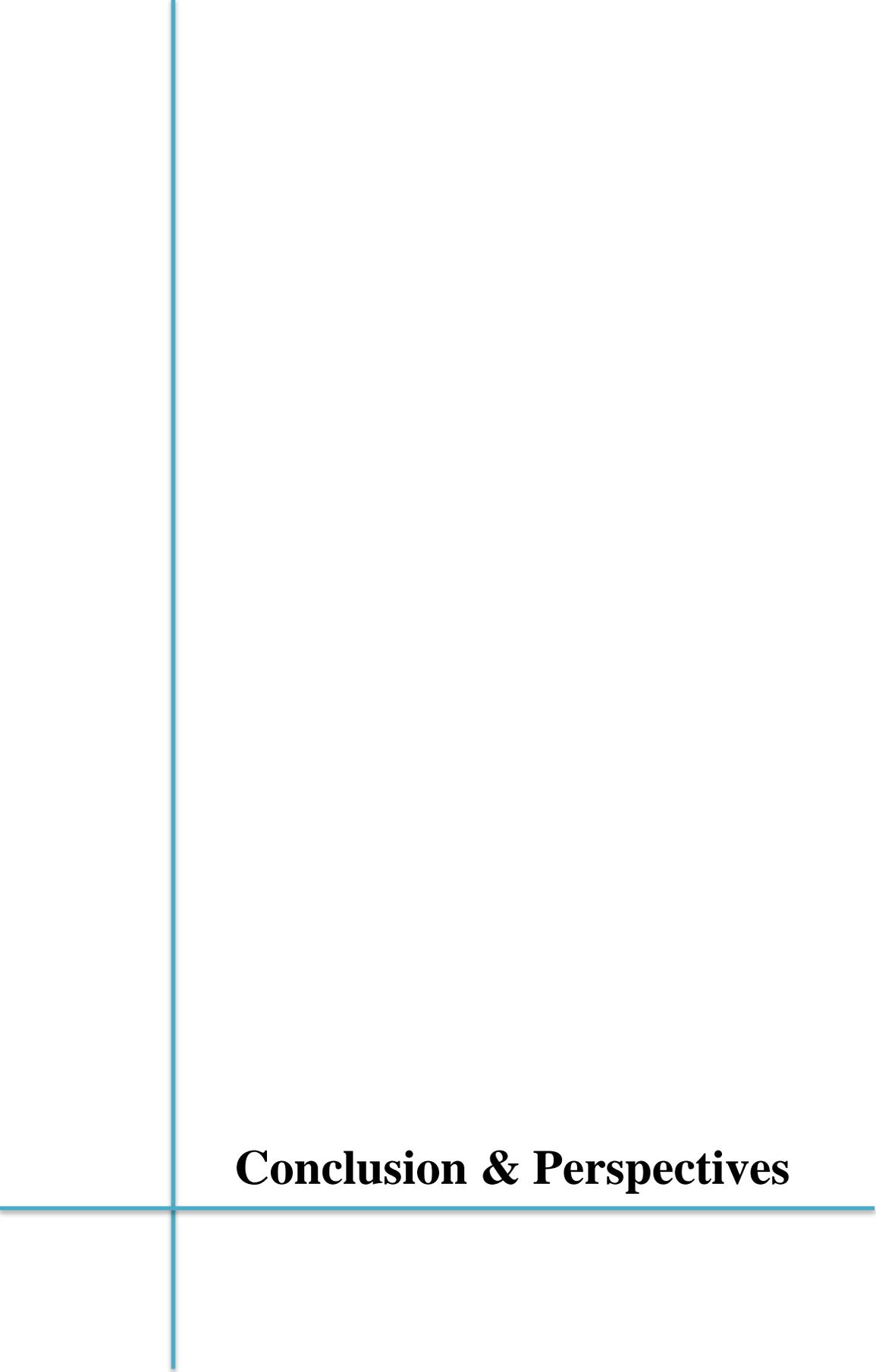
Le MnSO₄ montre une influence significative sur la croissance de la souche *Lb. plantarum*. Cet ingrédient a été rapporté comme étant essentiel pour la croissance de la même souche par Wegkamp *et al.*, 2009, il la protège contre le stress oxydatif (Groot *et al.*, 2005). Zhang *et al.*, (2014) ont aussi indiqué que ce facteur influence positivement la croissance de *Lb. rhamnosus*.

Le pH n'a pas d'effet significatif sur la croissance des souches lactiques. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Aasen *et al.*, (2000) lors de l'étude la croissance de *Lb. sakei*.

L'effet de l'agitation est non significatif, ce qui corrobore le résultat de Brinques *et al.*, (2010) observé lors de la production de biomasse de *Lb. plantarum*.

D'une façon générale, les lactobacilles étudiés se cultivent mieux sur HESM que sur HAIP et MRS, ceci est dû à la richesse du HESM en protéines, car le sabot est une matière essentiellement composée de kératine dont l'hydrolyse produit une large gamme d'acides aminés (Marshall *et al.*, 1977). Les sabots sont aussi très riches en sels minéraux, y compris le calcium, le fer, le potassium, le manganèse, le magnésium et le phosphore (Sargentini, 2012).

La comparaison des coûts de production des différents milieux formulés a montré que les milieux à base des hydrolysats étudiés sont plus économiques. Ceci est lié au remplacement des sources d'azote coûteuses par d'autres substituts issus de déchets. Ces sources (peptone, extrait de viande et extrait de levure) constituent 68.47% du prix du milieu MRS.



Conclusion & Perspectives

Conclusion et perspectives

Les intestins de poulet et les sabots de mouton comme les autres déchets d'abattoir constituent des bio-ressources à haute teneur en protéines mais qui restent sans aucune exploitation en Algérie. L'utilisation des hydrolysats issus de ces sous-produits comme base pour la formulation de milieux de culture pour certains lactobacilles a donné des résultats de croissance très prometteurs.

Quelque soit le type d'hydrolyse appliqué (hydrolyse chimique ou bien enzymatique), les deux matières étudiées ont donné des hydrolysats caractérisés par une richesse en protéines. Cependant, l'hydrolyse enzymatique semble être plus efficace pour la farine de sabots, alors que l'autolyse produit le meilleur hydrolysats pour la pâte d'intestin.

L'optimisation par les plans d'expériences des milieux de culture à base des hydrolysats sélectionnés (HAIP et HESM) a permis de mettre en évidence des formulations permettant une croissance maximale des lactobacilles étudiés.

La sélection des paramètres des milieux influençant significativement la croissance des souches est réalisée avec le PPB. Ce plan a montré l'effet dominant du glucose qui a été fortement exigé par toutes les souches et sur les deux types d'hydrolysats. Le citrate d'ammonium a exercé un effet significatif et positif sur la croissance de *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* sur HAIP et sur celle de *Lb. plantarum* sur HESM. Le sulfate de manganèse a montré une influence significative et positive sur la croissance de *Lb. plantarum* sur HAIP.

L'optimisation des niveaux des facteurs par le PCC a permis d'élaborer des milieux de culture optimaux qui supportent des croissances maximales des quatre *Lactobacillus* étudiés.

La comparaison des paramètres de croissance des souches sur les milieux optimisés avec le milieu standard MRS a donné des résultats très probants, ce qui témoigne de la richesse des substrats non seulement en protéines révélées par le dosage, mais aussi en acides aminés, en certains sels minéraux et en bases puriques et pyrimidiques pouvant ainsi remplacer l'extrait de levure et sels testés ayant montré des effets négatifs ou non significatifs.

A l'exception de la souche *Lb. plantarum* qui a donné la meilleure croissance sur HAIP supplémenté de 20.83 g/L de glucose et 0.03 g/L de MnSO₄, les autres lactobacilles ont

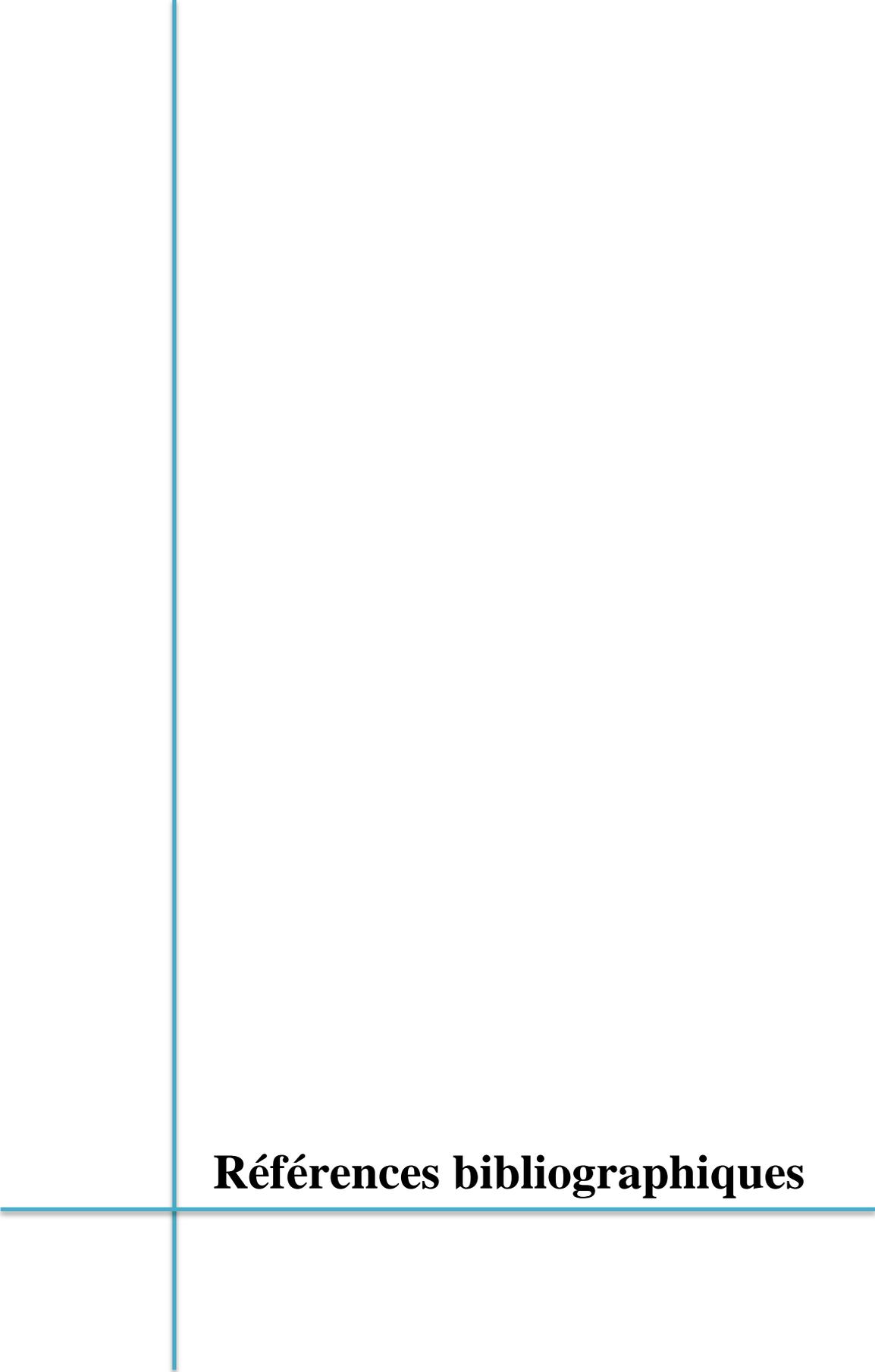
préfére le milieu HESM additionné seulement de glucose à une concentration inférieure à 20g/L pour des croissances maximales qui dépassent celles obtenues sur HAIP et MRS.

L'estimation approximative des coûts des milieux optimisés a donné des résultats très encourageants. En effet, le prix de revient d'un litre de ces milieux est évalué entre 330 et 480 DA, alors que le litre de MRS est vendu 3 à 4 fois plus cher.

La voie d'exploitation de ces deux sous- produits d'abattoir pour la formulation des milieux de culture semble être une bonne solution pour la gestion des déchets d'abattoir et pour la réduction des coûts de production des ferments lactiques.

Les résultats de cette étude sont intéressants et méritent d'être complétés par :

- Un élargissement de la gamme de bactéries lactiques étudiées.
- Une analyse du contenu des hydrolysats en acides aminés, vitamines...
- Des essais de production de métabolites d'intérêt technologique sur ces milieux (enzymes, bactériocines...).



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Aasen, I.M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. et Storro, I., (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biot.* 53: 159-166.
2. Abachi, L., (2015). Marché de la volaille en Algérie. Le poids effarant des réseaux clandestins. Quotidien Le Soir d'Algérie. Publié le 26/10/2015.
3. Adams, M.R. et Marteau, P., (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 263-264.
4. Afilal, M.E., Bakx, A., Belakhdar, N. et Membrez, Y., (2010). Evaluation of the biogas potential of organic waste in the northern provinces of Morocco. *Revue des Energies Renouvelables.* 13: 249 – 255.
5. Allal, M., (2015). L'Algérie à la 5^{ème} place mondiale. Production de viande ovine. Quotidien Econews. Publié le 10/08/2015.
6. Alloui, N., (2011). Situation actuelle et perspectives de modernisation de la filière avicole en Algérie. Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole. Tours.
7. Amrane, A. et Prigent, Y., (1996). A novel concept of bioreactor: Specialized function two-stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid. *Journal of Biotechnology.* 45: 195-203.
8. ANME, (2010). Etude sur le développement de la méthanisation industrielle. Rapport préliminaire. Etat des lieux de la méthanisation industrielle en Tunisie.
9. Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L. et Moschetti, G., (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology.* 30: 8–16.
10. Aspino, S.I, Horn, S.J. et Eijsink, V.G.H., (2005). Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 248(1):65-68.
11. Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A. et Arendt, E. K., (2015). Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiology.* 47: 36–44.
12. Axelsson, L., (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology *In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* Salminen, S, Wright, A. T et Ouwehand, A. 3^{ème} Edition. Marcel Dekker, Inc. New York.

13. Babel, W., Schulz, D., Giesen-Wiese, M., Seybold, U., Gareis, H., Dick, E., Schrieber, R., Schott, A. et Stein, W., (2000). Gelatin. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. DOI: 10.1002/14356007.a12_307.
14. Baliarda, A., (2003). Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat. L'Université Bordeaux 1. France.
15. Barrangou, R., Lahtinen, S. J., Ibrahim., F. et Ouwehand, A. C., (2011). Genus Lactobacilli, In: S. Lahtinne, S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press, London, pp. 77-92.
16. Baudry, C. et Brezellec, H., (2006). Microbiologie, immunologie. Édité par : Porphyre, 2^{ème} édition. Pp : 126.
17. Berecka, M. P., Waśko, A., Kordowska-Wiater, M., Podleśny, M., Targoński, Z et Kubik-Komar A., (2010). Optimization of Medium Composition for Enhancing Growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN Using Response Surface Methodology. *Polish journal of microbiology*. 59 (2): 113-118.
18. Bernardeau, M., Guguen, M. et Vernoux, J. P., (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology reviews*. 30: 487–513.
19. Bertani, G., (1951). Studies on *Lysogenesis*. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.
20. Berthomet, E., (2007). Gestion des sous-produits animaux en abattoir, Étude technique. Techniciens Supérieurs des Services du Ministère de l'Agriculture, Spécialité vétérinaire.
21. Bharti, P. K., Khan, M. I. et Singh. H., (2010). Taguchi's off line method and Multivariate loss function approach for quality management and optimization of process parameters -A review. AIP Conference Proceedings 1298, 486.
22. Björkroth, J., et Holzapfel, W., (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., et Stackebrandt, E. (Eds). The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. 3^{ème} édition. Springer Verlag. New York, USA. pp 267-319.

23. Bohacz, J., (2017). Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J Microbiol Biotechnol.* 33 (1):13.
24. Bornert, G., (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét.* 151-11:1003-1010.
25. Boucherba, N., (2015). Valorisation des résidus agro-industriels. Université Abderrahmane Mira de Béjaïa. Algérie.
26. Bourgeois, C.M. et Larpent, J.P., (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed Technique et documentation. pp. 523.
27. Box, G. E. P. et Wilson, K. B. (1951). *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B.* 13, 1–38; *Discussion:* 38–45.
28. Bracquart, P., (1981). An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. *Journal of Applied Microbiology.* 51(2) : 303-305.
29. Branger, A, Richer. M, Roustel. S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri Editions. Pp : 203.
30. Briggs, M., (1953). An improved medium for lactobacilli. *Journal of Dairy Research.* 20 (1): 36- 40.
31. Brinques, G.B., Peralba, M.C. et Ayub, M.A.Z., (2010). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J. Ind. Microbiol.Biot.* 37: 205-212.
32. Capozzi, V., Russo, P., Ladero. V., Fernández. M., Fiocco. D., Alvarez, A. M., Grieco. F., et Spano, G., (2012). Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a Potential Application in Wine. *Front Microbiol.* 3: 122.
33. Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo. G., (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science.* (79): 483–499.
34. CE : Commission Européenne., (2005). Abattoirs et équarissage : Document de référence sur les meilleures techniques disponibles.
35. Charalampopoulos, D., Pandiella S.S. et Webb, C., (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *J Appl Microbiol.* 92(5): 851-859.

36. Cheng, F., Wan, T., Liu, Y., Chen, C., Lin, L. et Sakata, R., (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Anim. Sci. J.* 80: 91–97.
37. Chermesh, I. et Eliakim, R., (2006). Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005? *World J Gastroenterol* .12: 853–857.
38. Choi, S.S., Kim, Y., Han, K.S., You, S., Oh, S. et Kim, S.H., (2006). Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Lett Appl Microbiol.* 42: 452–458.
39. Chopin, A., (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 12: 21-38.
40. Clément, B., (2000). Conception robuste : Les concepts et la méthodologie de Taguchi dans le design de produits. École Polytechnique de Montréal et Génistat Conseils Inc. Pp 28.
41. CNA : Conseil National de l'Alimentation. (2011). Quelle place pour les protéines animales transformées (PAT) dans l'alimentation des porcs, des volailles et des poissons ?. Avis n°70. Paris. France.
42. Coelho *et al.*, (2017). Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering.* 87: 787-795.
43. Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., et Suzzi G., (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Front Microbiol.* 3: 248.
44. Coutand, M., (2007). Étude technologique et environnementale des résidus d'incinération de farine animale dans la matrice cimentaire. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. Pp : 306.
45. Damle, M., Harikumar, P., et Jamdar, S., (2010). Chicken intestine: A source of aminopeptidases. *ScienceAsia.* 36 : 137–141
46. De Man, J.C., Rogosa, M. et Sharpe, M.E., (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology.* 23(1): 130–135.
47. De Nadra. M. C.M., (2007). Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* A. Méndez-Vilas (Ed.) FORMATEX. 500- 510.

48. De Roos, N. et Katan, M., (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 405–411.
49. DEFRA: Department for Environment, Food and Rural. (2011). Affairs. Controls on Animal By-Products Guidance on Regulation (EC) 1069/2009 and accompanying implementing Regulation (EC) 142/2011, enforced in England by the Animal By-Products (Enforcement) (England) Regulations 2011. Version 4.
50. Derbal, K., Bencheikh-LeHocine, M. et Meniai, A. H., (2012). Production of Biogas from Sludge Waste and Organic Fraction of Municipal Solid Waste. Production of Biogas from Sludge Waste and Organic Fraction of Municipal Solid Waste, Biogas, Dr. Sunil Kumar (Ed.). pp 151-172.
51. Dorrit, W., Tudor, S.G., Zamfir, M. et De Vuyst, L., (2013). Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93: 3352–3361.
52. Dortu, C., (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat. Université de Gembloux. Belgique. 131 p.
53. Doublier, G., Lecomte, C., Naquin, P., (2010). Typologie des déchets en vue de la classification des déchets de la ville d'Ouagadougou. Projet stratégie de réduction des déchets d'Ouagadougou. Pp : 24.
54. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith, F., (1956). Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 26: 350-356.
55. Ducrotté, P., Sawant, P., et Jayanthi, V., (2012). Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology.* 18(30): 4012–4018.
56. Eloy, C. et Lactose, R., (1997). Composition d'un milieu de culture destiné à effectuer le dénombrement des micro-organismes thermophiles du yoghourt. *Bulletin de la Recherche Agronomique Gembloux.* 11 : 83-86.
57. Elliker, P. R., Anderson, A. W. et Hannesson, G., (1956). An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *Journal of Dairy Science.* 39: 1611-1612.
58. Ellner, P. D., (1956). A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology.* 71:495-496.

59. EREP, (2009). Valorisation des résidus organiques par biométhanisation dans la région d'Oujda (Maroc). Rapport final. Traitement et valorisation de déchets et effluents organiques. Suisse.
60. Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I.H., Dahmen, I., Nasri, M., (2011). Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochem.* 46 : 1731–1737.
61. Falagas, M. E., Betsi, G. I. et Athanasiou, S., (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect.* 13: 657–664.
62. Fenardji, F., (1990). Organisation, performances et avenir de la production avicole en Algérie. In : Sauveur B. (ed.). L'aviculture en Méditerranée. Montpellier : CIHEAM, p. 253- 261.
63. Ferrada, B. M. F., Hollmann, A., Delfederico. L., La Hens. D. V., Caballero, A. et Semorile. L., (2013). Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 29: 1537-1549.
64. Ferreira *et al.*, (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta.* 597 : 179–186.
65. Folch, J., Lees, M. et Sloane-Stanely, G.H.S., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
66. Fonden, R., Mogensen, G., Tanaka, R. et Salminen, S., (2000). Culture-containing dairy products effect on intestinal microflora, human nutrition and health current knowledge and future perspectives. *Bull. Int. Dairy Fed.* 352: 1-30.
67. Fondén, R., Saarela, M., Mättö., J. et Mattila-Sandholm. T., (2003). Lactic acid bacteria (LAB) in functional dairy products. In: functional dairy products. chapter 10. Mattila-Sandholm. T., et Saarela. M. 259-277. Cambridge England.
68. Fooks, L.J., Fuller, R. et Gibson, G.R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int Dairy J.* 9 : 53–61.
69. Foret, S., (2011). Étude d'un nouveau procédé de fractionnement des co-produits de fabrication de jambon sec et des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des extraits et raffinats. Sciences des Agro-ressources. Université de Toulouse. pp 266.

70. Franco, J., (2008). Planification d'expériences numériques en phase exploratoire pour la simulation des phénomènes complexes. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
71. Frick. J.S., Schenk, K., Quitadamo, M., Kahl, F., Köberle, M., Bohn, E., Aepfelbacher, M. et Autenrieth. I. B., 2007. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 13: 83–90.
72. Fuller, R., (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
73. Fuquay, J. W., Fox, P.F. et McSweeney. P.L.H., (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press. pp 4170.
74. Galdeano, C. M. et Perdígón. G., (2006). The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clin Vaccine Immunol*. 13(2): 219–226.
75. Gallego, M. B., Mazzo, J. E., Sánchez, M. M., Carre, M. P., Codina, A. F., Brugué, S. A., Sierra, B. et Castellana. J. C., (2011). El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CECT7315/7316 mejora el estado de salud general em personas de edad avanzada. *Nutrición Hospitalaria*. 26(3): 642–645.
76. Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N. et Lucas, R., (2011). Food Applications and Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. *J, Spain*. 253-390.
77. Gan, B. S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P. et Howard. C. J., (2002). *Lactobacillus fermentum* RC-14 Inhibits *Staphylococcus aureus* Infection of Surgical Implants in Rats. *J Infect Dis*. 185. 9: 1369-1372.
78. Gao, X., Qiao, S.Y. et Lu, W.Q., (2009). Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Lett. Appl. Microbiol*. 49: 556-561.
79. Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. et Parmentier, M., 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon By-products Hydrolysates. *Food Science*. 69: 615–622.
80. Girard, P., (2008). Valorisation des graisses animales en alimentation porcine : Réglementation, situation actuelle en France et dans l'UE, et perspectives. la revue technique de l'IFIP. TechniPorc, 4 : 25-28.

81. Givry, S., (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Thèse de doctorat. Université De Reims Champagne-Ardenne.
82. Goffin, P., van de Bunt, B., Giovane, M., Leveau, J. H.J., Hoppener-Ogawa, S., Teusink, B. et Hugenholtz, J., (2010). Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Molecular Systems Biology* 6:413.
83. Gromert, N. et Axelsson, I., (2009). *Lactobacillus reuteri* effect on atopic eczema in childhood. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 48:148-149.
84. Groot, M.N., Klaassens, E., de Vos, W.M., Delcour, J., Hols, P. et Kleerebezem, M., (2005). Genome-based in silico detection of putative manganese transport systems in *Lactobacillus plantarum* and their genetic analysis. *Microbiology.* 4:1229-1238.
85. Guiraud, J. P., Rosec, J. P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed: AFNOR. Pp: 300.
86. Guss, M. L., et Delwiche, E. A., (1954). *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology.* 67(6) : 714-717.
87. Haines, R., (2004). Ferme à la fourchette : Rapport d'examen de la réglementation et de l'inspection des viandes. Une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en Ontario. le ministère du Procureur général de l'Ontario.
88. Halewym, M.A. et Chevalier, P., (2007). Prions et farines carnées destinées à l'alimentation porcine : Risques pour la santé humaine. Institut national de santé publique du Québec. Pp : 92.
89. Hammes, W. P., et Vogel, R. F., (1995). The genus *Lactobacillus*. In: The genera of lactic acid bacteria. B. J. N. Wood (Eds.). New York: Chapman & Hall. pp. 19–54.
90. 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.
91. Harish, K. et Varghese, T., (2006). Probiotics in humans – evidence based review. *Calicut Medical Journal.* (4) pp 11.
92. Harley, J.P., Klein, D. et Lansing, M., (2010). Microbiologie. 3^{ème} édition. Pp : 1216.

93. Hartemink, R., Domenech, V. R., et Rombouts, F. M., (1997). LAMVAB--A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*. 29(2): 77-84.
94. Hasan, M. N., Sultan, M. Z., et Mar-E-Um M., (2014). Significance of Fermented Food in Nutrition and Food Science. *J. Sci. Res.* 6 (2): 373-386.
95. Hattori, K., Yamamoto, A., Sadai, M., Taniuchi, S., Kojima, T., Kobayashi, Y., Iwamoto, H., Namba, K., Yaeshima, T., (2003). Effects of administration of bifidobacteria on fecal microflora and clinical symptoms in infants with atopic dermatitis. *Alerugi*. 52: 20–30.
96. Hayek, S.A. et Ibrahim, S.A., (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*. 4: 73-87.
97. Hayek. S. A., (2013). Use of Sweet Potato to Develop a Medium for Cultivation of Lactic Acid Bacteria. Thèse de doctorat. Université de North Carolina A&T State.
98. He, S., Wang, F., Ning, Z., B. et Wang, Y., (2015). Autolysis of Anchovy (*Engraulis japonicus*) Protein: Evaluation of Antioxidant Properties and Nutritional Quality of Resulting Hydrolysates. *Journal of aquatic food product technology*. 24: 417-428.
99. Heinemann, C., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Janssen, B. D., Busscher, H. J., Van der Mei, H. C. et Reid, G., (2000). Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol Lett*. 190 (1): 177-180.
100. Hiraga, K., Ueno, Y. et Oda, K., (2008). Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Activation by Ammonium Sulfate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 72:5. 1299-1306.
101. Hoinard, C., (2009). les plans factoriels fractionnaires. Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours. Pp : 24.
102. Horn, S.J., Aspino, S.I. et Eijsink, V.G.H., (2007). Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 1328–1334. *FEMS Microbiology Letters*. 248: 65–68.
103. Huang, S. et Liu, P., (2010). Inhibition of angiotensin I – converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. *J. Food Drug Anal.* 18: 458–463.

104. Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L. et Wang, Z., (2013). *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *J. Dairy Sci.* 96(5): 2746-2753.
105. Hugenholtz, J., (1993). Citrate metabolism in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 12: 165-178.
106. Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W. K. et Stanfield, P. S., (2004). Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. pp.1000
107. Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., et Rozès, N., (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology.* 31 (1): 1–8.
108. Ikeda, D.M., Eric, W.J., Kim, C.S.C., Joseph M.M., Sherri A.M., Cheyanne, K., et Michael, W.D., (2013). Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. College of Agriculture and Human resources. *Sustainable Agriculture.* SA-8.
109. Isolauri, E., Kirjavainen, P.V. et Salminen, S., (2002). Probiotics—a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut.* 50 (suppl III). 54–59.
110. Jamdar, S.N. et Harikumar, P., (2005). Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. *Bioresource Technol.*, 96: 1276-1284.
111. Jamdar, S.N. et Harikumar, P., (2008). A rapid autolytic method for the preparation of protein hydrolysate from poultry viscera. *Bioresour. Technol.* 99, 6934–6940.
112. Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. et Bawa, A. S., (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol.* 49(3):278–293
113. Journal officiel de l'Union européenne. (2009). Règlement (CE) No 1069/2009 du Parlement Européen Et Du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) no 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux).
114. Journal officiel. (1988). Loi relative aux activités de médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale, p. 90. (N° JORA : 004 du 27-01-1988).
115. Juste, J., (2010). Usage of animal by-products of slaughterhouses for the production of biogas. Legal aspects and characterisation. Libro de Actas II Congreso Español de Gestión Integral de Deyecciones Ganaderas p.337-346. International Workshop on Anaerobic Digestion of Slaughterhouse Waste. 9–10.

116. Kakkar, P., Madhan, B. et Shanmugam, G., (2014). Extraction and characterization of keratin from bovine hoof: A potential material for biomedical applications. *SpringerPlus*. 3:596.
117. Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H. et Isolauri, E., (2003). Probiotics and prevention of atopic disease—a 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 361: 1869–1871.
118. Kannan, A., Sekar, M., Mohan, K. M. S., Rajan, M. R., (2008). Poultry by-product meal as an alternative protein source in grower pig diets. *Indian J. Field Vet.* 3: 37-38.
119. Karamac, M., Flaczyk, E., Wanasundara, P.K.J.P.D., Amarowicz, R., (2005). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates obtained from muscle food industry by-products – a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 133–138.
120. Kassas, Z., Djeghri-Hocine, B., Hanoune, S., Derradji, Z., Boudour, A., et Boukhemis, M., (2015). Optimization of Split Pea and Dry Figs-Based Media for the Growth of *Lactobacillus plantarum* through Plackett-Burman and Response Surface Methodological Approaches. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 18 (3): 122-128.
121. Kato, I., Yokokura, T., Mutai, M., (1983). Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. *Microbiol Immunol*. 27(7):611-618.
122. Kenneth, C., (2007). Lactic acid bacteria taxonomy. *In: Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*. Fugelsang, Kenneth C., Edwards, Charles G. Springer. 29-44.
123. Khalisanni, K., (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 3: 1-13.
124. Khuri, A. I. et Mukhopadhyay, S., (2010). Wiley Interdiscip. *Rev. Comput. Stat.* 2 (2): 128–149.
125. Kim, J. H., Shoemaker, S. P. et Mills, D. A., (2009). Relaxed control of sugar utilization in *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*. 155: 1351–1359.
126. Kjeldahl, J., (1883). A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*. 22. 366-382.
127. Kleerebezem, M., *et al.*, (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 1990–1995.

128. Kleerebezemab, M., Hols, P. et Hugenholtz, J., (2000). Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme Microb Technol.* 1:26. 840-848.
129. Kristinsson, H.G. et Rasco, B. A., (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 40(1):43-81.
130. Kröckel, L., (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. In: Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. Chapter 5. Kongo. M., Biochemistry, Genetics and Molecular Biology.
131. Kröckel, L., (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products, Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), InTech.
132. 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). Pp 10.
133. Kulp, W. L., (1927). An agar medium for plating *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. *Science.* 66: 512-513.
134. Kurbanoglu, E.B., (2003). Enhancement of lactic acid production with ram horn peptone by *Lactobacillus casei*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 20: 37-42.
135. La Hens, D.V. Ferrada, B.M., Delfederico, B., L., Caballero, A.C. et Semorile L. C., (2015). Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 21 : 49-56.
136. Labioui, H., Elmoualdi, L., Ouhssine, M. et Elyachioui, M., (2007). Traitement et valorisation des déchets en provenance d'abattoirs au Maroc. *Agrosolutions.* 18. Pp: 35.
137. Lapiere, O., (2010). L'utilisation des graisses animales, un enjeu de développement durable. *Nutrition-Santé.* 17 : 52-55.
138. Larpent, J. P., (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne : les principaux groupes bactériens. *Technique & Documentation.* Pp : 280.

139. Lasekan, A., Abu Bakar, F. et Hashim, D., (2012). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources *Waste Management* 33(3).
140. Le coq, R., (1965). Manuel d'analyse alimentaires d'expertises usuelles. Doin. Paris.
141. LeBlanc, J.G., Taranto, M.P., Molina, V. et Sesma, F., (2010). B-Group Vitamins Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. In Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, p. 341-359. Iowa: Wiley-Blackwell.
142. Ledesma, O.V., De Ruiz-Holdago, A.P., et Olivier, G., (1977). A synthetic medium for comparative studies of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*.
143. Lee, J., (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56:1-24.
144. Leroy, F., De Vuyst, L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol*. 15: 67-75.
145. Leveau, J. V. et Bouix, .M., (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'interet industriel. *Tec&Doc, Paris*. Pp : 612.
146. Li, H., Qiu, T., Huang, G. et Cao, Y., (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*. 9:85.
147. Linsalata, M., *et al.*, (2004). The Influence of *Lactobacillus brevis* on Ornithine Decarboxylase Activity and Polyamine Profiles in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Mucosa. *Helicobacter*. 9:165–172
148. Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L. et Randell, R.J., (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.
149. Luftig. J.T., Jordan. V.S.,(1998). Design of experiments in quality engineering. New York: McGraw-Hill.
150. MAAF: Ministere de L'agriculture et de L'alimentation Français. (2017). Guide du tri et du devenir des sous-produits animaux à l'abattoir et en établissements assimilés.
151. Malepeyre, F., et Bertran, H., 2010. Nouveau manuel complet de la fabrication des colles. Emotion Primitive. Fontaine. 522.
152. Mane, S., Damle, M., Harikumar, P., Jamdar, S. et Gade, W., (2010). Purification and characterization of aminopeptidase N from chicken intestine with potential application in debittering. *Process Biochem*. 45: 1011–1016.

153. Marshall, R. C., Gillespie, J.M., (1977). The keratin proteins of, wool, horn and hoof from sheep. *Aust J. Biol. Sci.* 30: 389-400.
154. Marteau, P.R., de Vrese, M., Cellier, C.J. et Schrezenmeir J., (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 73:430S–6S.
155. Marth, E. H. et Steele, J. L., (2001). *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker Inc.
156. Martinez, F.A., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D., et de Souza Oliveira, R.P., (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol. Adv.* 4:482-8.
157. Matsuzaki *et al.*, (1998). The effect of Oral Feeding of *Lactobacillus casei* Strain Shirota of Immunoglobulin E Production in Mice, *Journal Dairy Science.* 81: 48-53.
158. Meignen, B., Onno, B., Gélinas, P., Infantes, M., Guilois, S. et Cahagnier. B., (2001). Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology.* 18: 239-245.
159. Mellak, L., (2016). L'Algérien consomme 15 kg de poulet par an. *Quotidien Econews*. Publié le 08/12/2016.
160. Meyer, A. Deiama, J. Bernard, L., (2004). Cours de microbiologie générale. Édité par : *Doin*, 2^{ème} éd. Pp : 430.
161. Mikelsaar, M., et Zilmer, M., (2009). *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis.* 21(1): 1–27.
162. Moreau, S., (2002). Risques sanitaires liés aux unités de compostage des déchets : présentation de deux études. Fédération Nationale des Activités de la Dépollution et de l'Environnement. France.
163. Morelli, L., Calleagri, M.L., Vogensen, F.K. et von Wright, A., (2012). Genetics of Lactic Acid Bacteria. In Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. et von Wright, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edition, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, 17-38.
164. Moshood, A. Y. et Tengku Haziyaamin, A.T.A., (2013). Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin Producer: A Mini Review. *IOSR Journal of Pharmacy.* 3: 44-50.
165. Mounirattinam et Bernatchez., (2011). L'enfouissement des animaux morts à la ferme : Direction générale de la santé animale et de l'inspection des aliments. Québec.

166. Mozzi, F., Raya, R.R. et Vignolo, G.M., (2010). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell. Publishing. 13.
167. Müller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G., et Simonetta, A. C., (2009). Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* LP 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 2031–2040.
168. Nakade, K., Kamishima, R., Inoue, Y., Ahhmed, A., Kawahara, S., Nakayama, T., Maruyama, M., Numata, M., Ohta, K., Aoki, T., Muguruma, M., (2008). Identification of an antihypertensive peptide derived from chicken bone extract. *Anim. Sci. J.* 79: 710–715.
169. Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard F., Boudrant J., (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technol.* 78: 149-153.
170. Nandhini, B., et Palaniswamy, M., (2013). Anticancer effect of goat milk fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei*. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3: 898-901.
171. Naveena, B.J., Altaf, M., Bhadriah, K., 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.
172. NCBI Taxonomy browser: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
173. Ningegowda, M. A. et Gurudutt, P. S., (2012). *In vitro* fermentation of probiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: Selectivity, viability and effect of metabolites on β -glucuronidase activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28: 901–908.
174. Nouad, M. A., (2011). Étude technico-économique de projets de valorisation/gestion de déchets liés à la filière avicole en Algérie. Pp : 58.
175. OESPA : Ordonnance concernant l'élimination des sous-produits animaux. (2011). élimination des sous-produits animaux. Conseil fédéral suisse.
176. Ohba, R., Deguchi, T., Kishikawa, M., Arsyad, F., Mormura, S. et Kida, K., (2003). Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen or keratin contained in livestock and fish waste. *Food Sci. Technol. Res.* 9: 91–93.

177. Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M., et Rodríguez, J. M., (2007). Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*. (23): 254–260.
178. Omar, M.N.A., Berge, O., El-Sayed, S.A., Balandreau, J., (1993). Whey as a growth medium for two spp. of *Azospirillum* grown in batch culture. Molke als wachstumsmedium für die batch-kultivierung bei 2 *Azospirillum*-Spezies. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. 148. 284-288.
179. Ouahabi, Y.R., Maamir, N.W. et Bensadok, K. (2016). Etude du potentiel biométhane des déchets d'abattoirs. *Revue des Energies Renouvelables*. 19 : 111 – 118.
180. Ouane, A. et Santara, S., (2004). Contribution à l'étude rhéologique des sabots, cornes et os d'animaux. *MSAS*. 119-124.
181. Ouwehand, A., Bianchi Salvadori, B., Fondeñ, R., Mogensen, G., Salminen, S., Sellars, R., Tanaka, R. (2003). *Health effects of probiotics*. *Bull. IDF* in press.
182. Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P, et Nychas, G-JE., (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 25 (2): 348–358.
183. Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 270–279.
184. Perdigón, G., De Macias, M.E.N., Alvarez, S., Oliver, G., De Ruiz Holgado, A.P. (1986). Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun*. 53: 404–410.
185. Pereira, D. I. A. et Gibson, G. R., (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (9): 4689–4693.
186. Perler, L. et Bruhn, S., (2004). Les sous-produits animaux sur le devant de la scène. *L'office vétérinaire fédéral*. Pp : 4-10.
187. Plackett, R.L. et Burman. J.P., (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305-325.

188. Pot, B., (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. *In*: Corrieu. G, and Luquet. F. M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Edition : Lavoisier. Paris. France .Pp : 1-152.
189. Pundir, R. K., Rana. S., Kashyap, N., et Kaur, A., (2013). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an *in vitro* study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3: 85-93.
190. Quinto, E. J., Jiménez, P, Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. et Girbés, T., (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*. 5: 1765-1775.
191. Rajalakshmi, S.N., Sharma, V., A., (2012). Antioxidant and ace inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions. *J. Food Biochem*. 36, 494–501.
192. Raju, A.A., Rose, C., Rao, N.M., (1997). Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. *Anim. Feed Sci. Technol*. 66 : 139-147.
193. Randriamahatody. Z., (2011). Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar. Thèse de Doctorat. Université D'antananarivo.
194. Rattanachaiakunsopon, P. et Phumkhachorn, P., (2010). Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their use in food production. *Ann. Biol. Res*. 1 (4): 218-228.
195. Reid, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner. R. et Bruce. A. W., (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 35 (2): 131-134.
196. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. et Penna, A.L.B., (2012). Lactic Acid Bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*. 4 (2): 124–140.
197. Ringo, E., (2004). Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming. *In*: Lactic Acid Bacteria, Salminen, S., A. Ouwehand and A. Von Weight (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, USA., pp: 581-610.
198. Robert, A., MacLeod et Snell. E. E., (1947). Some mineral requirements of the Lactic Acid Bacteria. *J. Biol. Chem*. (170):351-365.

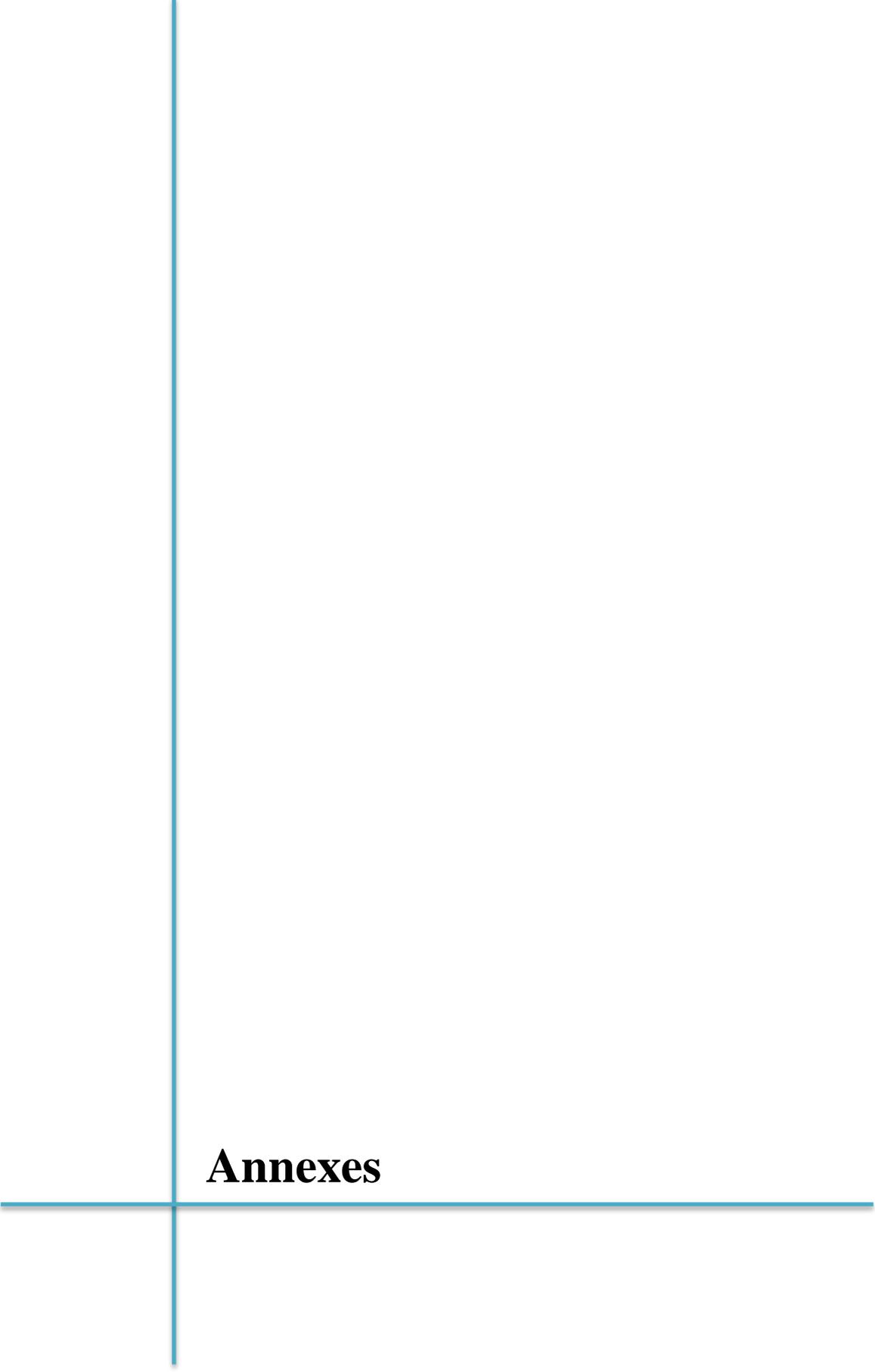
199. Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. et Oliveira, R., (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 32: 135–142.
200. Rogosa, M., Mitchell, J. A., et Wiseman, R. F., (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 62(1), 132.
201. Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., Paerregaard, A., (2003). Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 111(2):389-95.
202. Roudj, S., Belkheir, K., ZadiKram, H. et Karam, N., (2009). Proteolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *Eur. J. Sci. Res*. 34: 218-227.
203. Rouse, G. J. et Dyke, M. E. V., (2014). A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*. 3: 999-1014.
204. Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W. et Barberis, I. L., (2009). Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*. 59: 497-501.
205. Ruiz-Barba, J.L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragan, A. et Jiménez Díaz, R., (2010). Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiology*. 27 (3): 413–417.
206. Sabatini, N., Mucciarella, M.R., et Marsilio, V., (2008). Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea*, cv. *Moresca and Kalamata*). *LWT - Food Science and Technology*. 41 (10): 2017–2022.
207. Sabo, S. S., Vitolo, M., González, G. M.D. et Oliveira, R. P. S., (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*. 64: 527–536
208. Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A. et Rasco, B., (2009). Use of hydrolysates from yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-009-0225-8.

209. Saier, M. H., Ye, J. J., Klinke, S. et Nino, E., (1996). Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate- dependent fructose-specific phosphotransferase system and evidence for the Embden– Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 178: 314–316.
210. Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T. et Morimatsu, F., (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9586–9591.
211. Salminen, S. et Wright, A., (1993). *Lactic Acid Bacteria*. New York: Dekker.
212. Salovaara, H., (2004). Lactic acid bacteria in cereal based products. In "Lactic Acid Bacteria - Technology and Health Effects", 3^{ème} édition, S. Salminen et A. von Wright, (eds)., Marcel Dekker, Inc.
213. Sams, A.R., (2001). *Poultry meat processing*. Boca Raton. CRC Press.
214. Sargentini, C., Tocci, R., Andrenelli, L. et Giorgetti, A., (2012). Preliminary studies on hoof characteristics in Amiata donkey. *Italian Journal of Animal Science.*, 11:1, DOI: 10.4081/ijas.2012.e22.
215. Sauvageon, T., (2012). Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol. Université de Lorraine.
216. Savaiano. A. D., (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am J Clin Nutr.* 99 (suppl):1251S–5S
217. Siezen, R. J., *et al.* (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strain isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology.* 12 (3): 758–773.
218. Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M. et Tripathi C.K.M., (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front. Microbiol.* 7:2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087.
219. Sumengen. M., Dincer. S, Kaya. A. (2012). Phytase production from *Lactobacillus brevis*. *J Biol.* 36: 533-541.
220. Swillens., L., (2011). Circulaire relative aux engrais/amendement du sol contenant des sous-produits animaux. Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. pp : 9.

221. Tabinda, A.B. and Butt, A. (2012). Replacement of fish meal with PBM meal (Chicken intestine) as a protein source in carp (grass carp) fry diet. *Pakistan Journal of Zoology*. 44 : 1373-1381.
222. Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjöblom, M., Joutsen, M., Palva, A., E-L Ryhänen et Joutsjoki, V., (2004). Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology*. 39(5):439-44.
223. Terzaghi, B. E. et Sandine, W. E., (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 29(6), 807.
224. Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D., Francke, C., de Vos, W. M., Siezen, R.J. et Smid, E. J., (2006). Analysis of Growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a Complex Medium Using a Genome-scale Metabolic Model. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 40041-40048.
225. Todorov, S. D., (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: Production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 209–221.
226. Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G. et Franco, B.D.G.M., (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: characterization of a bacteriocin. *FRIN*. 44 (5): 1351–1363.
227. Todorov, S.D., Leblanc, J.G. et Franco B.D., (2012). Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. *World J Microbiol Biotechnol*. (3):973-984
228. Tomaro-Duchesneau. C., Jones, M. L., Shah, D, Jain, P, Saha, S, et Prakash, S., (2014). Cholesterol Assimilation by *Lactobacillus* Probiotic Bacteria: An *In Vitro* Investigation. *BioMed Research International* .Pp 9.
229. Tsai, C.C., Lin, P.P., Hsieh, Y.M., Zhang, Z.Y., Wu, H.C., Huang, C.C., (2014). Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Sci. World J*. 2014:690752.

230. Van Reenen, C.A. et Dicks, L.M., (2010). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*. 193(3), 157-168.
231. Vazquez, J.A. et Murado, M.A., (2008). Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. *Enzyme and Microbial Technology*. 43: 66–72.
232. Vázquez, J.A., González, M.P. et Murado, M.A., (2004). Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. *J Biotechnol.* (3): 299-311.
233. Venuste. M, Zhang, X., Charles, F., Shoemaker, Karangwa, E., Abbas S. et Kamdem, P. E., (2013). Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food & Function*. 4: 811-820.
234. Verdenelli, M. C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., et Cresci, A., (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*. 48: 355–363
235. Vivier, S., (2002). Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille.
236. Waki, N., Matsumoto, M., Fukui. Y., et Sukanuma, H., (2014). Effects of probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 on incidence of influenza infection among schoolchildren: an open-label pilot study. *Lett Appl Microbiol*. 59(6): 565–571.
237. Walsh, C.B., (2014). The use of Animal By-products The improving opportunities to add value to the beef and sheep slaughtering sectors. EBLEX. Pp. 73.
238. Wang, I.J., Wang, J.Y., (2015). Children with atopic dermatitis show clinical improvement after *Lactobacillus* exposure. *Clin Exp Allergy*. 45(4):779-787.
239. Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, Bao Q., (2012). Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J. Dairy Sci*. 95(4):1645-1654.
240. Wang, S., (2012). Effects of *Lactobacillus Strains* on Colon Cancer Cell Proliferation and Cell Cycle Blockage; Sch. of Food Sci. & Eng., Harbin Univ.,

- Harbin, China ; Lanwei Zhang ; Wei Gu. *Biomedical Engineering and Biotechnology*.
241. Wegkamp, A., B. Teusink, W.M. de Vos et E.J. Smid., (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*. 50:57–64.
242. Woo, S.I., Kim, J.Y., Lee, Y.J., Kim, N.S., Hahn, Y.S., (2010). Effect of *Lactobacillus sakei* supplementation in children with atopic eczema-dermatitis syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 104(4):343-8.
243. Wright, V. A. et Axelsson, L., (2011). *Lactic Acid Bacteria* An Introduction. In Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Von Wright, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria* Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton, 1-15.
244. Zadi-Karam, H. et Karam, N. E. (2006). Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *TROPICULTURA*. 24 (3) : 153-156.
245. Zhang, Y., Ng, I.S., Yao, C. et Lu. Y., (2014). Orthogonal array deciphering MRS medium requirements for isolated *Lactobacillus rhamnosus* ZY with cell properties characterization. *J. Biosci. Bioeng*. 118(3): 298-304.
246. Zuber, M., Zia, F., Zia, K. M., Tabasum, S., Salman, M. et Sultan, N., (2015). Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80: 366–374.



Annexes

Annexe 1

Milieu MRS (de Man, Rogosa & Sharpe, 1960)

Ce milieu est considéré comme milieu standard recommandé pour la croissance des lactobacilles. Sa composition est la suivante :

- Peptone10 g
- Extrait de viande08 g
- Extrait de levure.....04 g
- Glucose (C₆H₁₂O₆)20 g
- Tween 801 ml
- Phosphate de potassium.....02 g
- Citrate d'Ammonium.....02 g
- Sulfate de Magnésium.....0.20 g
- Sulfate de Manganèse.....0.05 g
- Agar.....15 g
- Eau distillée.....1000 ml

Les composants du milieu sont dissous dans de l'eau bouillante, après refroidissement à 50°C ± 1°C, le pH est ajusté à 6.2- 6.5 à l'aide d'un pH-mètre, la stérilisation est réalisée à 121°C ± 1°C pendant 15 mn (Leveau *et al.* 1991).

Annexe 2 : Dosage des protéines (Méthode de Lowry *et al.*, 1951)

L'échantillon à doser est préalablement dilué, ainsi à 1 ml de celui-ci on rajoute 1 ml de la « solution C » dont la composition est présentée ci-dessous. Après 10 minutes, 3 ml du réactif de Folin dilué au 1/10^{ème} est ajouté rapidement et le mélange est bien agité et laissé reposer à l'obscurité pendant 45 minutes à température ambiante.

L'absorbance est lue à 750 nm et la courbe d'étalonnage est établie avec des concentrations de BSA allant de 0 à 1000 µg/ml.

Les réactifs utilisés sont préparés comme suit :

- Solution A = 20 g de Na₂CO₃ dans 1000 ml de NaOH 0,1N
- Solution B = 5g de CuSO₄ 5 H₂O et 10g de tartrate double de potassium et sodium dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution C : 50 parties de réactif A pour 1 partie de réactif B.

la courbe d'étalonnage est la suivante :

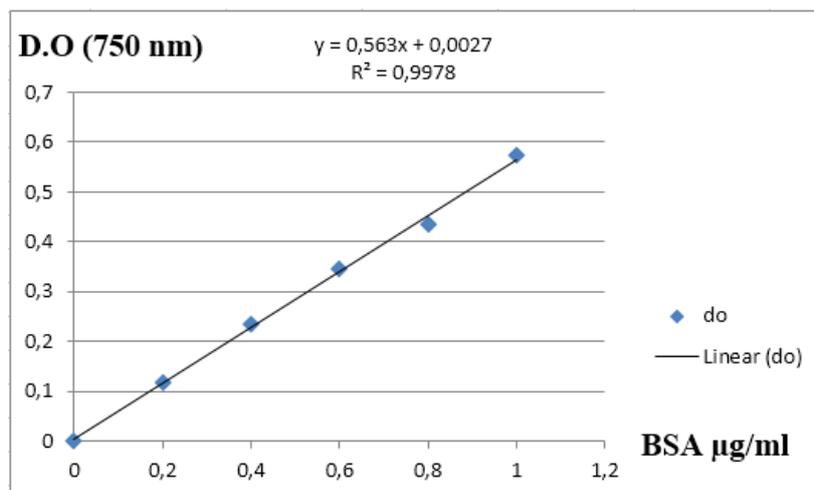


Figure 35: Courbe d'étalonnage des protéines

Annexe 3 : Dosage des sucres totaux (Méthode de Dubois *et al.*, 1956)

Un mélange de 1 ml de l'échantillon dilué, 1 ml de phénol à 5% et 5 ml de l'acide sulfurique 95% est préparé, bien agité et laissé reposer 10 min à température ambiante. Après incubation au bain-Marie à 30°C pendant 30 min les absorbances sont lues à 490 nm.

Les teneurs en sucres totaux ont été déterminés avec la courbe d'étalonnage suivante :

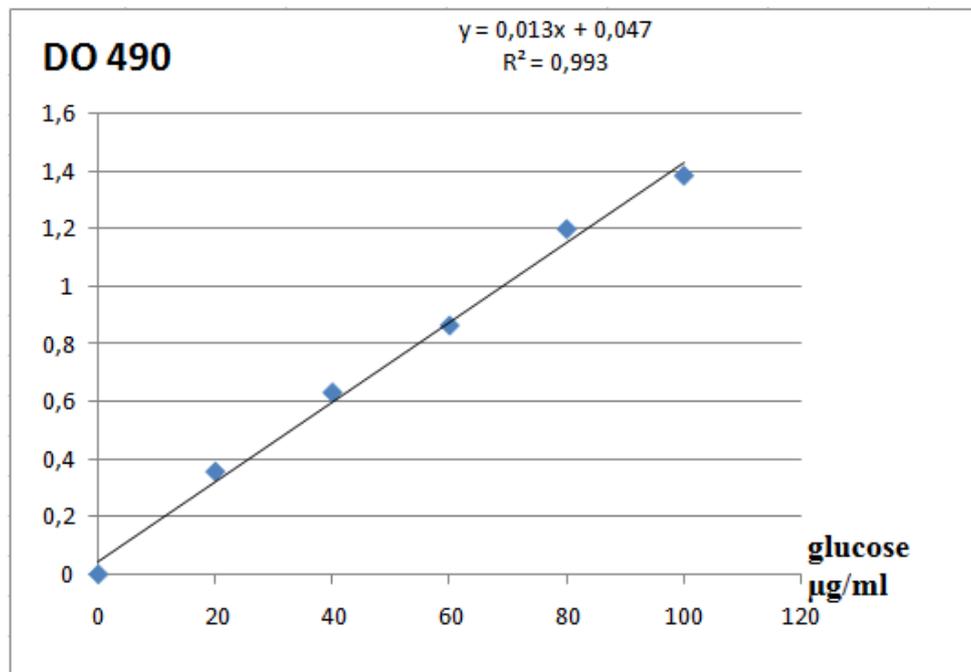


Figure 36: Courbe d'étalonnage des sucres totaux

Annexe 4 : Dosage des lipides (Méthode de Folch et *al.*, en 1957)

1g de l'échantillon (soit de farine de sabots ou pâte d'intestins) est homogénéisé avec 20 ml du mélange méthanol/chloroforme (2 :1 v/v). Après agitation magnétique de 15 à 20 min le mélange est filtré. Ensuite, l'extrait est lavé avec 0.2 v de NaCl (0.9%) puis le mélange est centrifugé à 2000 t/min pour séparer les deux phases. Enfin, la phase inférieure contenant les lipides est récupérée par évaporation sous- vide dans un évaporateur rotatif, récupérée et pesée.

Annexe 5 : Dosage de l'azote total (méthode de Kjeldhal, 1883)

1. *Minéralisation* : 0.5 de l'échantillon est placé dans un matras avec 0.5g de catalyseurs (K_2SO_4 et $CuSO_4$) puis 10 ml d'acide sulfurique sont ajoutés et la minéralisation est réalisée à chaud. A la fin de cette étape, l'azote est transformé en NH_4^+ .
2. *Distillation* : Dans cette étape, les ions ammonium sont convertis en NH_3 (ammoniac) par alcalinisation, ensuite, l'échauffement du minéralisât permet de dégager l'ammoniac sous forme de vapeurs, qui sont ensuite condensés. Pour ce faire, 50 ml NaOH sont ajoutés au minéralisât. La distillation est faite à chaud pendant 5 min dans un distillateur.
3. *Dosage* : L'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique qui piège l'ammoniac. Celui-ci est ensuite neutralisé avec l'acide sulfurique en présence d'un indicateur coloré composé de 10 V de bromocrésol et de 10 v de rouge de méthyle.

La teneur en azote total d'un échantillon est calculée comme suit :

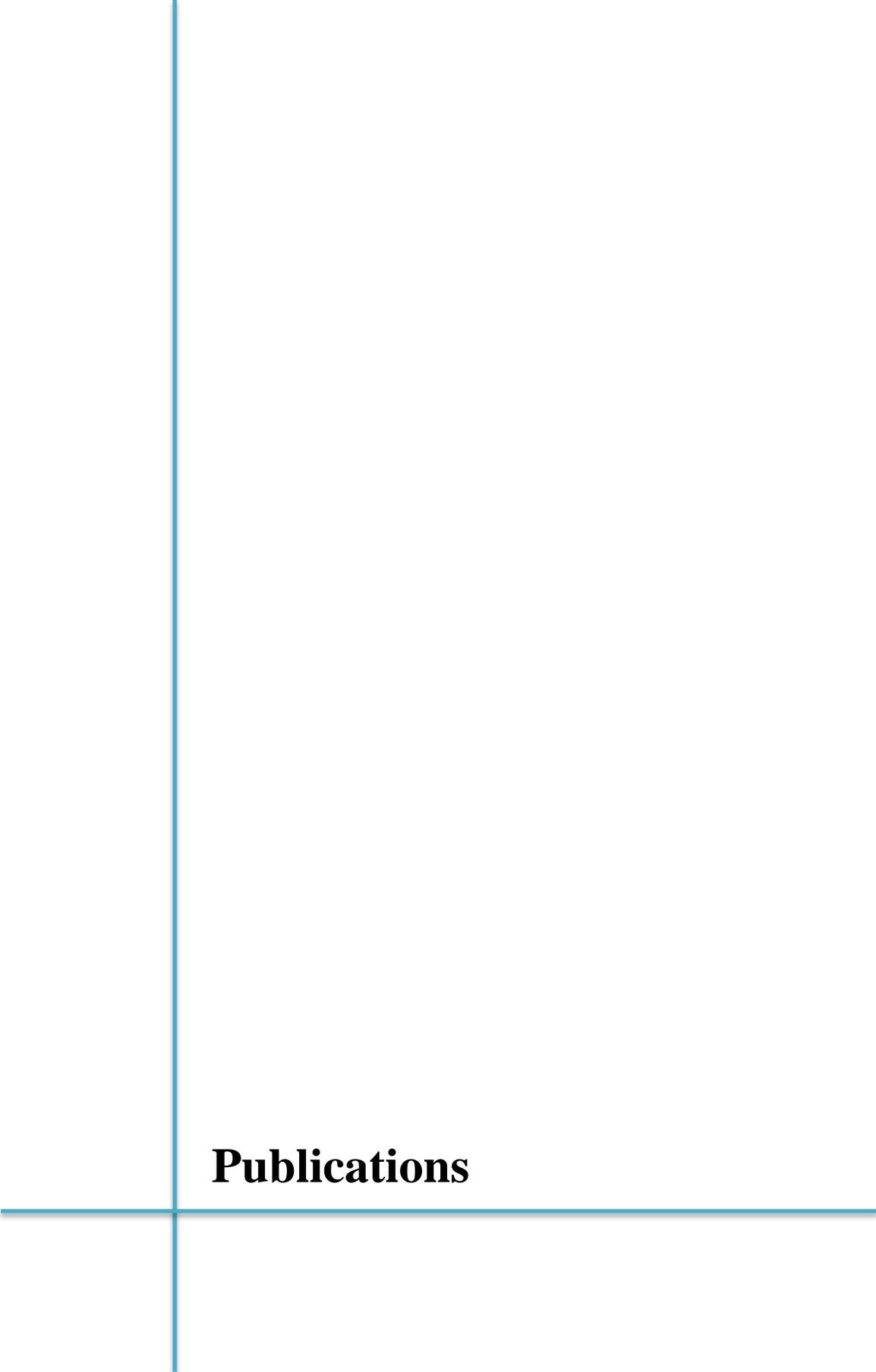
$$\text{Azote (\%)} = \frac{V \times N \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

Où :

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: volume de l'acide sulfurique (ml)

N : la normalité de l'acide

m : masse de l'échantillon (g)



Publications

Research Article

A Low Cost Medium Containing Chicken Intestine Autolysate for *Lactobacillus brevis* Growth: Statistical Optimization

¹Kelthoum Ahmed-Gaïd, ¹Messaouda Boukhemis and ²Baida Djeghri-Hocine

¹Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Badji Mokhtar BP12, Annaba, 23000,

²École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de L'aménagement du Littoral, Alger, Algérie

Abstract: The valorization of chicken intestine to formulate a growth medium for lactic acid bacteria was tested on a strain of *Lactobacillus brevis* CHTD27. For this purpose, an autolytic degradation of the chicken intestine was carried out. The resulted Chicken Intestine Autolysate (CIA) was used as basic medium, while other medium parameters were studied using a Plackett and Burman design to determine the significant factors affecting the strain growth. Those were further optimized using a central composite design. As a result, CIA containing 19.15 g/L of glucose and 0.25 g/L of ammonium citrate supported good growth of *L. brevis* with a final optical density value of 6.00 at 600 nm, which is 32% higher than that on the standard medium MRS. Thus, medium containing CIA could constitute a low-cost alternative to MRS medium for the production of *L. brevis* biomass.

Keywords: Autolysis, chicken intestine, growth medium, *Lactobacillus brevis*, statistical optimization

INTRODUCTION

Actually, Lactic Acid Bacteria (LAB) are exploited in various areas for their beneficial properties. They are used as starter cultures for the elaboration of fermented food (LeBlanc *et al.*, 2010). They are also the major representatives of probiotics both on the food and the pharmaceutical markets (Franz *et al.*, 2010). Looking to their importance, LAB must be produced in large scales. A commonly used growth medium is Man, Rogosa, Sharpe medium (MRS), but this medium is too expensive because it is composed of costly nitrogen sources. For example, yeast extract, which is important for a high lactic acid production is estimated to account for about 38% of the total production cost (Hujanen *et al.*, 2001). To reduce the cost of LAB biomass production, several studies undertook the formulation of low-cost media for LAB using low-cost substrates or by-products generally known to be rich in protein (Aspmo *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2005; Safari *et al.*, 2009).

In Algeria, because of the important consumption of poultry meat, poultry slaughterhouses generate substantial amounts of by-products every day and chicken intestine is one of the major wastes from this industry. Indeed, slaughterhouses wastes including poultry by-products are not valorised in Algeria, but are usually buried or incinerated and may consequently lead to environmental contamination and pose a threat to animal and human health (Escudero *et al.*, 2014).

Therefore, it is important to find alternative solutions for their treatment (Edström *et al.*, 2003).

In order to solve the problems of high amounts of animal's by-products and LAB biomass production costs, this study proposes, as a solution, the exploitation of chicken intestines to formulate a growth medium for a LAB strain (*Lactobacillus brevis*). The use of statistical experimental designs allowed to define easily and exactly the composition of the new growth medium. The growth of *L. brevis* on the optimized medium was compared with that on the commercial medium (MRS) to define which one supported the highest growth of the strain.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Chicken Intestine Autolysate (CIA): Chicken intestines were collected from the slaughterhouse of DraaErrich in Annaba, Algeria immediately after the slaughtering. They were thoroughly washed in running water to remove their content and frozen in boxes at -20°C until use. The autolytic degradation was carried out according to Jamdar and Harikumar (2008); a homogenate composed of 40% of chicken intestine and 60% of distilled water was ground in a Moulinex blender for 5 min. pH was adjusted to 2.8 by adding 2N HCl. After that, the homogenate was dispensed into 250-mL Erlenmeyer flasks and incubated in a shaking incubator at 55°C and 150 rpm for 6 h. Autolysis was terminated by

Corresponding Author: Kelthoum Ahmed-Gaïd, Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Badji Mokhtar BP12, Annaba, 23000, Algérie, Tel.: +213 797 17 81 87; Fax: +213 38 87 26 53

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (URL: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

inactivation of samples at 90°C for 20 min; after heating, the clear supernatant phase was recuperated, centrifuged at 4000 g for 25 min and filtered to obtain the CIA.

Proximate composition: The protein concentration was estimated by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as the standard, total sugars were determined according to Dubois *et al.* (1956) and lipid content according to Folch *et al.* (1957). Dry matter was calculated after drying samples at 105°C for 24 h, ash content after heating to 550°C for 5 h.

Microorganism and bacterial growth estimation: *Lactobacillus brevis* CHTD27 from the collection of Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB) (Essenia, Oran, Algeria) was originally isolated from raw camel milk collected in *Tindouf* (Roudj *et al.*, 2009). The strain was stored as frozen stock held at -20°C in milk, monthly reactivated in sterile MRS broth and propagated on MRS agar slants at 37°C. After fermentation, the optical density of samples was measured at 600 nm (OD₆₀₀) to estimate the biomass concentrations. Samples were diluted with their corresponding media to ensure that the OD₆₀₀ value is less than 0.6.

Medium and growth conditions: Cultures were carried out in flasks of 200 ml containing 30 mL of media composed of CIA as a basic medium. Other components, pH and agitation speed were varied according to the experimental design. After autoclaving and cooling, media were inoculated with 3% of the inoculum and incubated in a rotary shaker at 37°C for 24 h.

Experimental designs:

Plackett and Burman Design (PBD):

PBD is a fractional factorial design used to select, among a large number of factors, those having the most important effect on the studied response. It is a useful tool because it allows the study of *k* number of factors in only *k*+1 runs (Plackett and Burman, 1946). The model is of the form:

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

where,

- \hat{Y} = The response (OD₆₀₀)
- β_0 = The constant
- β_i = The coefficients of linear terms
- X_i = The coded forms of variables

In this study, PBD was used to evaluate the effects of medium parameters on *L. brevis* growth. The total number of experiments was 12 (Table 1). The variables were medium components (Glucose, yeast extract, ammonium citrate, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄ and Tween 80), physicochemical parameters (pH and agitation) and tow dummy (*X*₅ and *X*₁₁). Variables were tested at two levels: higher and lower (Table 2). The statistical significance of the regression coefficients was determined by Student's t-test using statistical software package MINITAB version 16.2.1.0. Variables showing a confidence level greater than 95% were considered to significantly influence the strain growth.

Central Composite Design (CCD): To maximize the growth of *L. brevis*, variables selected by the PBD to have significant effects were optimized using CCD. Factors were tested at five levels shown in Table 3. The second order polynomial equation is the following:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{12} X_1 X_2$$

where,

- \hat{Y} = The response
- β_0 = The model constant
- X_1 and X_2 = The independent variables
- β_1 and β_2 = The linear coefficients
- β_{11} and β_{22} = The quadratic coefficients
- β_{12} = The cross product coefficient

CCD results were interpreted using MINITAB software version 16.2.1.0. The significance of the model was checked by the R² value and the model *F*-value. The 3D surface plot was realized using Design Expert version 9.0.3.1 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, MN, USA).

Table 1: Plackett-Burman experimental design matrix and OD₆₀₀ results

Run order	Factors											OD ₆₀₀
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(X ₅)	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	(X ₁₁)	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	1.5780
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	1.0580
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	4.7316
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0.3740
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.6000
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	0.4430
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	3.1660
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2.8530
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	3.1750
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1.0420
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	4.0980
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.3300

+1: Higher level. -1: Lower level. X₅ and X₁₁ are Dummies

Table 2: Levels of the variables tested in Plackett–Burman design

Factors	Symbol	High level (-1)	Low level (+1)
Glucose (g/L)	X_1	0	20
Yeast extract (g/L)	X_2	0	5
Ammonium citrate (g/L)	X_3	0	2
Potassium phosphate (g/L)	X_4	0	2
Dummy	X_5	-	-
Magnesium sulfate (g/L)	X_6	0	0.2
Manganese sulfate (g/L)	X_7	0	0.05
Tween 80 (mL)	X_8	0	1
pH	X_9	5.8	6.5
Agitation (rpm)	X_{10}	0	150
Dummy	X_{11}	-	-

Table 3: Central composite design for testing two factors: glucose and ammonium citrate

Factors	Levels				
	-1,41421	-1	0	+1	+1,41421
Glucose	9.307	12	18.5	25	27.692
Ammonium citrate	0.017	0.1	0.3	0.5	0.582

Validation experiments: The confirmation test was carried out in triplicate by the cultivation of the strain in CIA supplemented with the optimized concentrations of factors obtained by CCD. The observed and the predicted values of OD₆₀₀ were compared to judge the model validity.

Comparison of *L. brevis* growth on CIA medium and MRS medium: To evaluate the efficiency of the CIA as a growth medium, the strain was cultivated for 24 h in MRS medium and the optimized medium, then, final OD₆₀₀ values obtained were determined and compared.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition: Dry matter in the CIA was estimated at 0.5%. DM chemical composition was

87.78% of protein, 1.18% of fat, 0.26% of sugar and 9.5% of ash. Protein content was close to that found by Jamdar and Harikumar (2008) in chicken viscera autolysate obtained using the same autolysis degradation process (content of 84%). The high protein content revealed the efficiency of the autolytic degradation to produce good quality of hydrolyzate; this is mainly due to the activity of endogenous aspartic proteases present in intestinal tissue (Jamdar and Harikumar, 2005).

Screening of significant parameters influencing the cell growth: PBD was used to screen the influence of nine variables on the growth of *L. brevis*, OD₆₀₀ results are shown in Table 1, the significance of each variable checked by Student “t” test is shown in Table 4. Analysis of PBD results showed different levels of influence; the value of R² was 99.59%, while the adjusted R² was 97.74%.

Figure 1 represents Pareto chart graph and the *p*-line that distinguishes the significant factors and bar lengths proportional to the factors effects. Glucose (X_1), yeast extract (X_2) and ammonium citrate (X_3) were found to exert a significant effect on biomass production (\hat{Y}) with *p*-values of 0.003, 0.032 and 0.01 respectively. The model equation for biomass concentration was expressed in terms as following:

$$\hat{Y} = 2,037 + 1,229 X_1 - 0,357 X_2 + 0,580 X_3$$

Other variables showed *p*-values higher than 0.05 and considered as not significant. It was clear that glucose had the most important effect on *L. brevis* growth. This may be explained by the poorness of CIA in sugars and the necessity of a carbon source for the growth, since the critical ingredient in MRS medium

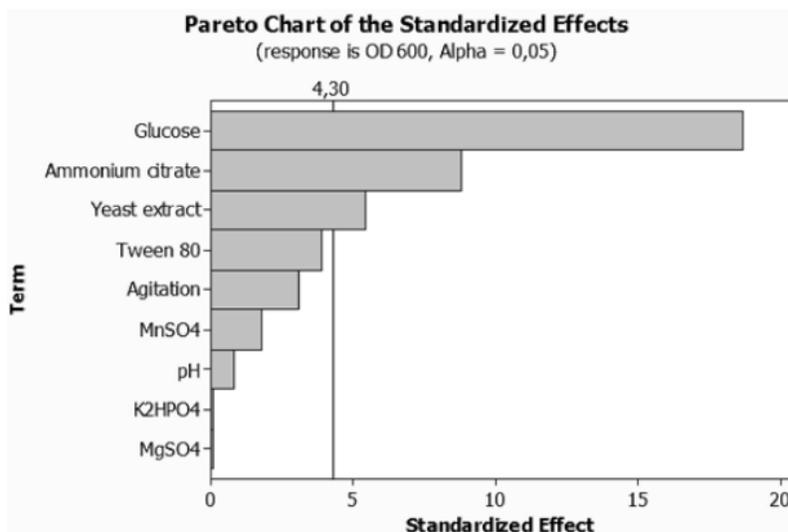


Fig. 1: Pareto chart for screening of significant effects on *L. brevis* CHTD27 growth

Table 4: Statistical analysis of Plackett-Burman design results

Term	Effect	Coef.	SE Coef.	t-value	p-value
Constant		2.0374	0.06589	30.92	0.001
Glucose*	2.4591	1.2295	0.06589	18.66	0.003
Yeast extract*	-0.7148	-0.3574	0.06589	-5.42	0.032
Ammonium citrate*	1.1601	0.5801	0.06589	8.80	0.013
K ₂ HPO ₄	0.0141	0.0070	0.06589	0.11	0.925
MgSO ₄	0.0131	0.0066	0.06589	0.10	0.930
MnSO ₄	0.2411	0.1206	0.06589	1.83	0.209
Tween 80	0.5141	0.2571	0.06589	3.90	0.060
pH	0.1062	0.0531	0.06589	0.81	0.505
Agitation	-0.4068	-0.2034	0.06589	-3.09	0.091

R² = 99.59%, R²(pred) = 85.18%, R²(adj) = 97.74%; *: Statistically significant at 95% confidence level

Table 5: Analysis of variance for the quadratic model

	Coef	SE Coef	t- value	p- value
Constant	6.06600	0.02741	221.294	0.000
X ₁	0.09696	0.02167	4.474	0.003
X ₂	-0.23189	0.02167	-10.701	0.000
X ₁ ²	-0.46487	0.02324	-20.004	0.000
X ₂ ²	-0.48488	0.02324	-20.865	0.000
X ₁ . X ₂	0.00250	0.03065	0.082	0.937

X₁ is glucose and X₂ is ammonium citrate; R² = 99.21%, R²(pred) = 95.31%, R²(adj) = 98.64%

for *Lactobacillus* are those related to the carbon source concentration (Zhang *et al.*, 2014). Nitrogen sources present in the medium were CIA, yeast extract (organic nitrogen sources) and ammonium citrate (inorganic nitrogen source). From the PBD results, yeast extract and ammonium citrate were selected as significant factors, however ammonium citrate had a positive effect while yeast extract influenced negatively the cell growth. The suitable explanation of these results is that inorganic nitrogen sources are quickly metabolized by microorganisms for fast growth, while organic sources are sustainable nitrogen sources (Baixin *et al.*, 2011). On another hand, Vazquez *et al.* (2004) studied the use of fish viscera autohydrolysates for LAB growth and supposed that LAB could maintain a stable consortium in the intestinal space because of the availability of peptidic fractions produced by proteolytic enzymes of the digestive tract. They concluded that the autohydrolysis of viscera homogenates could generate peptidic fragments (peptones) suitable for the culture of lactic acid bacteria. Regarding the fact that LAB exist naturally in chicken intestine and its autolysis was carried out using its own proteolytic enzymes (autolytic degradation), the hypothesis of Vazquez *et al.* (2004) describes exactly our case. So we can suggest that CIA may contain peptidic fragments suitable for the LAB strain growth. Thereby, yeast extract, as an organic nitrogen source seemed efficiently replaced by CIA and its addition in the medium appears to be undesirable and justifies its negative effect. Concerning nitrogen sources, we suppose that *L. brevis* used ammonium citrate and CIA which recovered sufficiently its requirements, while yeast extract was not needed and might be a superfluous ingredient which causes growth inhibition when added.

Tween 80 was found to have an insignificant effect; this result corroborate that obtained by Gao *et al.* (2009) who indicated that Tween 80 is not required by *L. fermentum*. K₂HPO₄ effect was insignificant, similarly, Zhang *et al.* (2014) indicated that K₂HPO₄ had no significant effect on the growth of *L. rhamnosus*. MgSO₄ and MnSO₄ showed no significant influence on the growth. The insignificance of pH influence is in accordance with the result found by Aasen *et al.* (2000) who showed that pH effect on *L. sakei* growth is relatively small and the optimum pH for its growth is 6-6.5. The agitation effect was insignificant; Brinques *et al.* (2010) also observed this result in a study undertaken *L. plantarum* biomass production.

Eventually, positive significant variables (glucose and ammonium citrate) were included in the central composite experiment for the optimization. For the next experiments, the pH of media was adjusted to 6.5 and the cultures were carried out in an incubator without agitation.

Optimization of significant variables: CCD was used to optimize the concentrations of two factors selected by the PBD (glucose and ammonium citrate). Analysis of variance ANOVA of the results is shown in Table 5. The large variation of OD₆₀₀ values ranged from 4.80 to 6.09 and reflected the necessity of the medium optimization to attain optimal growth potentials. The coefficient of determination R² was 0.9921 which is so close to 1; this indicates the ability of the model to explain 99.21% of data variability and suggests an excellent correlation between observed and predicted OD₆₀₀ values. The adjusted R² value of 98.64 % indicates that the model is significant. The lack of fit was found to be insignificant (0.082) and the high *F*-value (174.74) support the high significance of the model. *p*-value of the model was less than 0.001 and for the two experimented factors, linear and quadratic coefficients were very significant, while the interaction between them was not (*p* = 0.937). The second order polynomial equation is the following:

$$\hat{Y} = 6,066 + 0,096 X_1 - 0,231 X_2 - 0,464 X_1^2 - 0,484 X_2^2 + 0,002 X_1 X_2$$

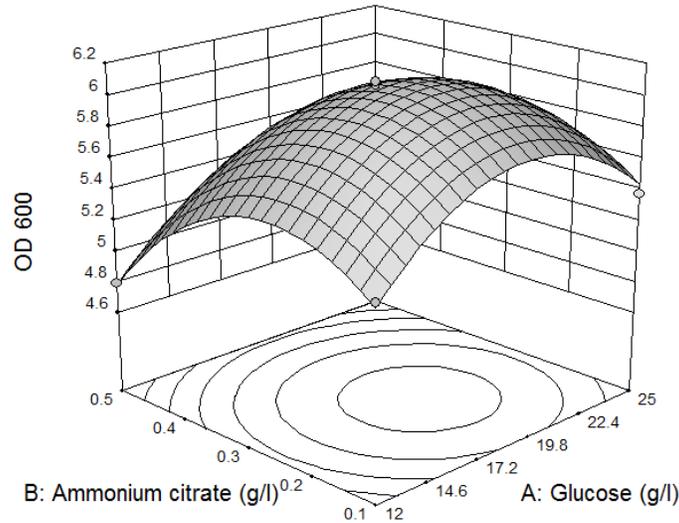


Fig. 2: Three-dimensional surface plot for the combination effect of glucose and ammonium citrate on *L. brevis* CHTD27 growth

where,

\hat{Y} = OD₆₀₀ value

X_1 = Glucose

X_2 = Ammonium citrate

Figure 2 shows the 3D Surface Plot of the OD₆₀₀ value against glucose and ammonium citrate. OD₆₀₀ value varies with the change of glucose concentration and found to be optimal at above 19.15 g/L. Meanwhile, ammonium citrate influenced highly the growth potential and gave the maximal growth at a concentration of 0.25 g/L.

Validation of the experimental model: *L. brevis* was cultivated on the optimized medium containing CIA and optimal concentrations of glucose and ammonium citrate obtained by the CCD (19.15g/L and 0.25 g/L respectively). The OD₆₀₀ value was found to be 6.00 (mean value) which is close to the predicted value of 6.098, confirms the adequacy of the model.

Comparison of the optimized CIA medium and MRS medium efficiency for *L. brevis* growth: The growth of *L. brevis* on the optimized medium was compared to that obtained on the MRS standard medium usually used for *Lactobacillus* growth. The results showed that the final OD₆₀₀ value reached in the optimized medium after 24 h of incubation was 6.00 (mean value) and surpassed that obtained in MRS medium which showed an OD₆₀₀ value of 4.53. Thus, the performance of the optimized medium was 32% higher than that of MRS medium; this may be explained by the richness of CIA in protein, the affinity of its peptidic fragments for LAB growth (as described earlier) and the addition of glucose as a carbon source. Moreover, CIA medium was formulated especially to support the growth of *L. brevis* by the selection of the required components and the removal of those having

negative effects on its growth. This was not the case for MRS medium; indeed, MRS was designed to support growth of the most fastidious LAB and consequently, some of its components may not be required for the growth of less nutrient-demanding species growth such as some lactobacilli (Horn *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Chicken intestine is regarded as an attractive source of protein presenting the advantage to be so abundant and not exploited. That is why; their use in the formulation of a growth medium for LAB can constitute a good way for their valorisation. The optimal growth of the strain was reached on a medium composed of CIA supplemented with glucose and ammonium citrate. This growth surpassed that obtained on the commercial medium MRS, hence, CIA produced from an animal by-product using a low-cost method deserves to replace efficiently the MRS medium composed of complex and expensive sources for *L. brevis* growth.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Pr. Nour Eddine Karam from Oran University, Algeria for the LAB strain. They also acknowledge the help of Pr. Aicha Mechakra-Maza from Mentouri University, Constantine, Algeria.

REFERENCES

- Aasen, I.M., T. Moretro, T. Katla, L. Axelsson and I. Storro, 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biot., 53: 159-166.

- Aspmo, S.I., S.J. Horn and V.G.H. Eijsink, 2005. Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248: 65-68.
- Baoxin, Z., W. Xiangjing and X. Wensheng, 2011. Optimization of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(37): 7225-7235.
- Brinques, G.B., M.C. Peralba and M.A.Z. Ayub, 2010. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 37: 205-212.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 26: 350-356.
- Edström, M., A. Nordberg and L. Thyselius, 2003. Anaerobic treatment of animal byproducts from slaughterhouses at laboratory and pilot scale. *Appl. Biochem. Biotech.*, 109: 0273-2289.
- Escudero, A., A. Lacalle, F. Blanco, M. Pinto, I. Diaz and I. Dominguez, 2014. Semi-continuous anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2: 819-825.
- Folch, J., M. Lees and G.H.S. Sloane-Stanely, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Franz, C.M.A.P., G.S. Cho, W.H. Holzapfel and A. Gálvez, 2010. Safety of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi, F., R.R. Raya and G.M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Iowa, pp: 211-232.
- Gao, X., S.Y. Qiao and W.Q. Lu, 2009. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49: 556-561.
- Horn, S.J., S.I. Aspmo and V.G.H. Eijsink, 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 1082-1089.
- Hujanen, M., S. Linko, Y.Y. Linko and M. Leisola, 2001. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-411. *Appl. Microbiol. Biot.*, 56: 126-130.
- Jamdar, S.N. and P. Harikumar, 2005. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. *Bioresource Technol.*, 96: 1276-1284.
- Jamdar, S.N. and P. Harikumar, 2008. A rapid autolytic method for the preparation of protein hydrolysate from poultry viscera. *Bioresource Technol.*, 99: 6934-6940.
- LeBlanc, J.G., M.P. Taranto, V. Molina and F. Sesma, 2010. B-group Vitamins Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi, F., R.R. Raya and G.M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Iowa, pp: 341-359.
- Lowry, O.H., M.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randell, 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman, 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305-325.
- Roudj, S., K. Belkheir, H. ZadiKram and N. Karam, 2009. Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *Eur. J. Sci. Res.*, 34: 218-227.
- Safari, R., A. Motamedzadegan, M. Ovissipour, J.M. Regenstein, A. Gildberg and B. Rasco, 2009. Use of hydrolysates from yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food Bioprocess Tech.*, DOI: 10.1007/s11947-009-0225-8.
- Vazquez, J.A., M.P. González and M.A. Murado, 2004. Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. *J. Biotechnol.*, 112: 299-311.
- Zhang, Y., I.S. Ng, C. Yao and Y. Lu, 2014. Orthogonal array deciphering MRS medium requirements for isolated *Lactobacillus rhamnosus* ZY with cell properties characterization. *J. Biosci. Bioeng.*, 118(3): 298-304.

Enhancement of lactic acid bacteria growth using sheep hooves hydrolyzate

^{1*}Ahmed-Gaïd, K., ¹Boukhemis, M. and ²Djehgri-Hocine, B.

¹Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University BP12, 23000 Annaba, Algeria

²Nationale High Ecole of Marine Science and Coastal Development, Algiers, Algeria

Article history

Received: 27 September 2015

Received in revised form:

21 January 2016

Accepted: 15 February 2016

Abstract

Sheep hooves were subjected to an enzymatic hydrolysis using papain to produce hooves hydrolyzate (HH). Some HH based formulations were tested to support *Lactobacillus farciminis* DSM20184 growth, as a result, the combination of HH and 20 g L⁻¹ of glucose was selected as Hooves Medium (HM) and compared with MRS to cultivate other lactic acid bacteria. Generally, HM showed a good performance to support the strains growth, *L. fermentum* DSM20049 and *L. farciminis* showed the most significant results with maximal OD600 that are respectively 67.24% and 33.77% higher than those obtained on the standard medium MRS. Hence, the formulation of HM could constitute a good way to exploit sheep hooves and may be proposed as a suitable solution to reduce LAB biomass production costs.

Keywords

Sheep hooves

Enzymatic hydrolysis

Growth medium

Lactic acid bacteria, MRS

© All Rights Reserved

Introduction

Recently, formulation and optimization of new growth media became an important research field. This is due to the high costs of their components, and the need to enhance biomass and metabolites productions for technological aims. In fact, media high costs are essentially related to the nitrogen sources, such as peptones derived mainly from casein, soya and meat. (Vazquez and Murado 2008). To substitute the costly ingredients and to recover microorganisms requirements, several studies reported the formulation of media using inexpensive substrates like vegetables: potato extracts (Gaudreau *et al.*, 2002), dates (Nancib *et al.*, 2005), molasses (Coelho *et al.*, 2011), corn stover (Cui *et al.*, 2011), tomato pomace (Belmessikh *et al.*, 2013), split pea and dry figs (Kassas *et al.*, 2015). Other studies seemed to be more interesting reporting the use of cheaper substrates, which are biological wastes, for example: fish wastes (Clausen *et al.*, 1985; Horn *et al.*, 2005; Aspmo *et al.*, 2005; Vazquez and Murado, 2008), sheep horns (Kurbanoglu, 2004) and tuna heads (Safari *et al.*, 2009).

To evaluate the efficiency of new formulated media, those should be tested to cultivate fastidious microorganisms, that is why, Lactic Acid Bacteria (LAB) are the most group of microorganisms used for this aim. In spite of the availability of important results reporting the formulation of inexpensive media for biomass and metabolites productions from LAB,

(Horn *et al.*, 2005; Vazquez and Murado, 2008), MRS medium (de Mane Rogosa and Sharpe) stilled the most used laboratory medium, however, this medium showed a major inconvenient looking to its high cost. Nowadays, LAB biomass production become more and more important because of the characterization of new strains with beneficial properties which are exploited in food technology (Georgiva *et al.*, 2009), in cosmetic and in pharmaceutical industry (Franz *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2010), hence, it is important to find a solution to reduce their biomass production costs.

The present study aims to exploit sheep hooves to formulate a growth medium for LAB. This substrate is not exploited in any field in Algeria, moreover, it constitutes a source of environment pollution and health diseases, because, as other animal by-products, it is usually buried or incinerated with no pretreatment. This work describes the use of sheep hooves hydrolyzate as a nitrogen source and its combination with other components to formulate a cheap growth medium for five LAB strains from different origins. A comparative study with MRS medium was carried out to evaluate the performance of HM as growth medium.

Materials and Methods

Raw material

Sheep hooves were collected from the slaughterhouse immediately after the slaughtering.

*Corresponding author.

Email: agkelthoum@gmail.com

Tel: +213 797 17 81 87; Fax: +213 38 87 26 53

They were washed carefully in running water, dried at 50°C for 8h and were cut into small pieces; those were ground to obtain granular powder of 2-3 mm of size and frozen in boxes at -20°C until use.

Enzymatic hydrolysis

Hooves powder was mixed with distilled water (1:2 w/v) and the pH was adjusted to 6 by adding 1N HCl. The enzymatic hydrolysis using papain at 0.5% (w/w): enzyme to substrate ratio. The mixture was dispensed into 250-ml Erlenmeyer flasks; those were placed in a rotary shaker for 24h at 65°C and 150 rpm. The hydrolysis was terminated by the inactivation of the enzyme at 90°C for 20 min. The hydrolyzate was centrifuged 4000 rpm for 25 min and filtered to eliminate the fat layer, then the supernatant was recuperated (Hooves Hydrolyzate: HH).

Microorganisms

Five strains of lactic acid bacteria were used in this study: *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 and *Lactobacillus farciminis* DSM 20184 from the culture collection DSMZ. *Lactobacillus plantarum* BH14 and *Lactobacillus brevis* CHTD27 from the collection of Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB) (Essenia, Oran, Algeria) were originally isolated from raw camel milk collected in Tindouf (Roudj *et al.*, 2009), and *Lactobacillus rhamnosus* sp. isolated from baby feces. The strains were stored as frozen stock held at -20°C in milk. Inoculums were prepared by adding a colony to MRS broth and incubating it at 37°C for 18 h, before inoculation OD₆₀₀ of the inoculums were adjusted to 0.6.

Growth media and bacterial growth estimation

Media were composed of HH, 20 g L⁻¹ of glucose and 5 g L⁻¹ of yeast extract as following: HH: composed only of HH, HH-G: HH+ glucose, HH-G-Y: HH+ glucose +yeast extract, Y-G: yeast extract + glucose. MRS medium was used as standard for media comparison. pH of the media was adjusted to 6.5 by adding 0.1N NaOH. After autoclaving at 121°C for 15 min, media were cooled and inoculated with 3% of the inoculum and incubated at 37°C for 24 h. After fermentation, biomass concentrations were estimated by measuring optical densities of the samples at 600 nm (OD₆₀₀). Samples were diluted with their corresponding media to ensure that the OD₆₀₀ value is less than 0.6.

Growth kinetics

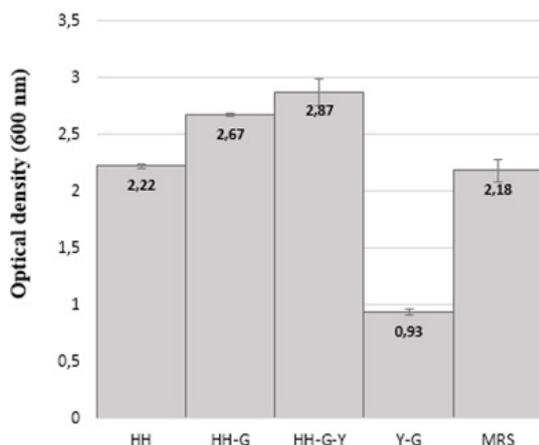
Growth kinetics of the five LAB strains on HM and MRS were studied for 28 h at 37°C, the curves

were monitored by measuring OD₆₀₀ every 2 hours. Analysis of variance of the results using MINITAB software version 16.2.1.0 was carried out to analyze the significance of the differences between the growth on MRS and HM (p < 0.05).

Results and Discussion

Selection of hooves medium composition

Growth results of *Lactobacillus farciminis* DSM20184 on the four HH media and the MRS medium are represented in figure 1. Those were significantly different (p<0.05), with finals OD₆₀₀ varying between 0.93 and 2.87. The best growth results were those of HH-G and HH-G-Y showing OD₆₀₀ of 2.67 and 2.87 respectively, which are significantly higher than that obtained on the standard medium MRS. HH performed well and showed a surprising growth result with a final OD₆₀₀ of 2.22, which is very close to that of MRS, this result indicates that the HH is rich in nutriment, and the strain of *L. farciminis* found its requirements in this hydrolyzate. As expected, the glucose had a significant effect on *L. farciminis* growth and its addition to the HH (HH-G medium) enhanced significantly the strain growth, this may be explained by the fact that LAB need a carbon source for their growth (Zhang *et al.*, 2014). The lowest OD₆₀₀ was observed in Y-G composed of glucose and yeast extract, in comparison with HH-G, this last induced a good growth potential, which is three-times superior than that obtained on Y-G. This result signifies that HH is more efficient than the yeast extract known to be rich in amino acids, nucleic acids and growth factors. To elucidate the effect of yeast extract supplementation, we tested the medium HH-G-Y, as a result, a significant difference was observed between growth on HH-G and HH-G-Y. The difference of 7.5% of growth due to the supplementation of yeast extract may not be considerable and could be negligible if we look to the cost of yeast extract as a medium component. Indeed, the remove of yeast extract could reduce significantly the medium cost, because this component has been reported to be very costly (Hujanen *et al.*, 2001) and several studies aimed to replace it. As the aim of this study is to formulate a “low cost” medium for LAB growth, we preferred to retain HH-G as sheep Hooves Medium (HM), looking to its low cost composition (only glucose and HH) and its high performance to cultivate *L. farciminis*. This medium was used for the further experiments and was tested to support other strains growth.



Results are means of triplicate measurements.

Figure 1. Growth of *Lactobacillus farciminis* DSM20184 on MRS, Y-G medium and HH based media.

Comparison of LAB strains growth on HM and MRS

A comparative study was carried out between this medium and the standard medium MRS to determine the efficiency of HM as growth medium for LAB. For this purpose, five LAB strains were grown on the two media and the growth parameters were compared (lag time, OD_{600} max and specific growth rate). OD_{600} max results are given in figure 2. In general, HM showed high performance to support the growth of the five strains. The most significant result was that of *L. fermentum*, this strain showed a high growth potential with a maximal OD_{600} of 6.74, which is 67.24% higher than that on MRS. Similarly, HH showed a good performance to cultivate *L. farciminis*, and the maximal OD_{600} surpassed that reached on MRS with 33.77%. *L. rhamnosus* sp. showed also a good growth potential (OD of 7.45) which is close to that observed on MRS but surpassed it significantly ($p < 0.05$). The important growth results of *L. fermentum*, *L. farciminis* and *L. rhamnosus* obtained on HM indicate that this medium, composed only of HH and glucose, was sufficient to recover their requirements and could be used to enhance their biomass production. For *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, although OD_{600} max results on HM were important (6.57 and 7.29 respectively), those were slightly lower than those obtained on MRS. These results may be due to the origin of these two strains, selected originally from camel milk known to be rich in nutrients, hence, they may be more fastidious and require others nutrients not found in HM.

Eventually, the HM cultivated well the LAB strains, further experiments should be carried out testing the cultivation of other type strains, to define their requirements and to determine the components to be added to HM to standardize it as a growth medium

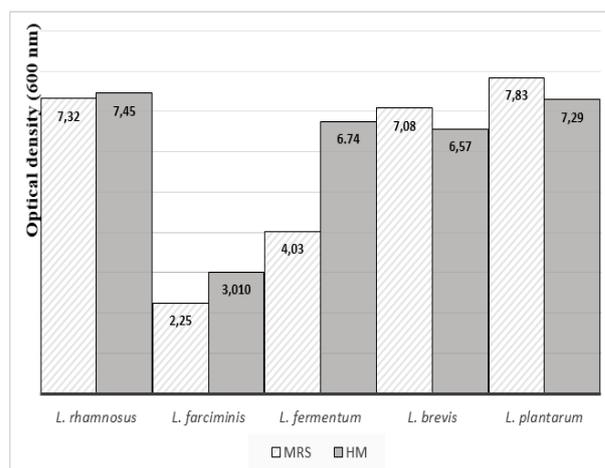


Figure 2. Maximal OD_{600} of the five strains reached on HM and the MRS.

for all LAB strains. In fact, MRS is appropriate for LAB growth but its composition was not based on their requirements, it was originally formulated to support the growth of some *Lactobacilli* growing imperfectly on tomato juice medium (de Man *et al.*, 1960). Thereby, some MRS components are not necessary required by all LAB strains. For example, Horn *et al.*, (2005) reported that nitrogen sources in MRS are in excess and are not incorporated into biomass, while the components used as carbon source were reported to be the critical ingredients in MRS medium for *Lactobacillus*. (Zhang *et al.*, 2014).

Figure 3 represents the kinetics of growth of the five strains on HM and MRS. On HM, specific growth rates were calculated and compared to those obtained on MRS (table1). From the general view, the five strains showed normal growth curves, and in except of *L. fermentum*, lag time of the strains was long specially that of *L. plantarum* and *L. brevis* which presented similar growth curves. The five strains reached their maximal growth after about 18 to 20 h, their μ_{max} comparison showed that growth rates on HM were higher than those on MRS for *L. rhamnosus* and *L. brevis*, while *L. fermentum*, *L. farciminis* and *L. plantarum* had grown faster on MRS.

Generally, HM was efficient to cultivate the five strains and it gave significantly good results in comparison with those of MRS. From these results we can conclude that sheep hooves hydrolyzates is a very promising product, because, as reported by many studies, animal's by-products are known to be rich essentially in protein (Selmane *et al.*, 2008), their hydrolysis could produce peptones of high quality which may serve for growth media formulation. In the same context, Aspomo *et al.*, (2005) studied the use of cod viscera hydrolyzate for LAB growth, and

Table 1. Specific growth rate (μ_{max} : h⁻¹) of LAB strains reached on HM and MRS.

	<i>L. farciminis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
HM	0.365	0.755	0.532	0.510	0.375
MRS	0.564	0.965	0.455	0.428	0.464

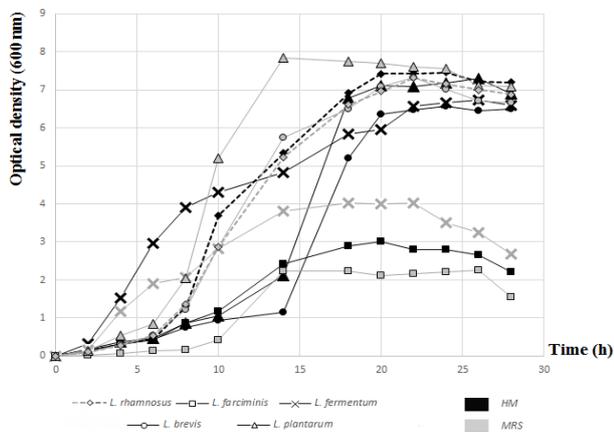


Figure 3. Growth kinetics of *L. fermentum*, *L. farciminis*, *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. rhamnosus* on HM and MRS.

Kurbanoglu *et al.*, (2004) used ram horn peptones to cultivate *Lactobacillus casei*, these substrates showed good efficiency, which confirm the utility of animal's by-products hydrolyzates as supplements for biomass and lactic acid productions from LAB.

Conclusion

This study proposed the use of a slaughterhouse by-product known to be rich in protein to solve the problem of costly media components. Sheep hooves hydrolyzate had successfully replace the yeast extract used as a nitrogen source. In addition, HM composed only of HH and 20g L⁻¹ of glucose showed a high performance to cultivate LAB strains especially *L. fermentum* DSM20049 and *L. farciminis* DSM20184. If applied, this way of exploitation will help for slaughterhouse waste management and will reduce environment pollution. Moreover, it may help for the reduction of LAB biomass production costs. Results found in this study are important and merit to be reinforced by optimizing medium for biomass and, probably, metabolites productions.

Acknowledgements

The work was financially supported by the laboratory of applied biochemistry and microbiology-University of Badji Mokhtar Annaba, Algeria. The authors would like to thank Pr. Nour Eddine Karam and the Pr. Abdeltif Amrane for the LAB strains.

References

- Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H. 2005. Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS-Microbiology Letters* 248: 65–68.
- Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z. and 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.
- Clausen, E., Gildberg, A. and Raai, J. 1985. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1556–1557.
- Coelho, L.F., De Lima, C.J.B., Rodovalho, C.M., Bernardo, M.P. and 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.
- Cui, F., Li, Y. and Wan, C. 2011. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology* 102: 1831–1836.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1): 130–135.
- Franz, C.M.A.P., Cho, G.S., Holzapfel, W.H. and Gálvez, A. 2010. Safety of Lactic Acid Bacteria. In Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, p. 211–232. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Gaudreau, H., Renard, N., Champagne, C.P. and Horn, D.V. 2002. The evaluation of mixtures of yeast and potato extracts in growth media for biomass production of lactic cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 626-634.
- Georgiva, R., Koleva, D., Nikolova, D., Yankov, D. and Danova, S. 2009. Growth parameters of *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23: 861-865.
- Horn, S.J., Aspmo, S.I. and Eijsink, V.G.H. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1082–1089.
- Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y.Y. and Leisola, M. 2001. Optimisation of media and cultivation conditions for L (+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-411. *Applied Microbiology Biotechnology*

56: 126–130.

- Kassas, Z., Djeghri-Hocine, B., Hanoune, S., Derradji, Z., Boudour, A., and Boukhemis, M. 2015. Optimization of Split Pea and Dry Figs-Based Media for the Growth of *Lactobacillus plantarum* through Plackett-Burman and Response Surface Methodological Approaches. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 18(3): 122-128.
- 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.
- LeBlanc, J.G., Taranto, M.P., Molina, V. and Sesma, F. 2010. B-Group Vitamins Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. In Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, p. 341-359. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Nancib, A., Nancib, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fik, M. and Boudrant, J. 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology* 96: 63–67.
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi Kram, H. and Karam, N. 2009. Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *European Journal of Scientific Research* 34: 218-227.
- Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A. and Rasco, B. 2009. Use of hydrolysates from yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology* 5:73–79.
- Selmane, D., Christophe, V. and Gholamreza, D. 2008. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science* 79: 640–647.
- Vázquez, J.A. and Murado, M.A. 2008. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 66–72.
- Zhang Y, Ng IS, Yao C, Lu Y (2014) Orthogonal array deciphering MRS medium requirements for isolated *Lactobacillus rhamnosus* ZY with cell properties characterization. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 118(3): 298-304.