

الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

**En MICROBIOLOGIE**

**Option : Microbiologie Appliquée**

**THEME**

Optimisation de la croissance de souches de bactéries lactiques  
d'intérêts biotechnologiques et probiotiques sur milieux à base de  
lactosérum et de lupin

Présentée par : **M<sup>elle</sup> Saida HANOUNE**

Directrice de thèse : Mme. Baida DJEGHRI-HOCINE      Professeur, Ecole Nationale Supérieure  
des Sciences de la Mer et de  
l'Aménagement du Littoral, Alger

**Membres de Jury :**

Présidente : Mme. Houria CHETTIBI      Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : Mr. Tarek MERAD      Maître de conférences A, Université d'Annaba

Mr. Abdelbasset MECHAI      Maître de conférences A, Université de Tébessa

Année universitaire : 2016/2017

## *Remerciements*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce travail de recherche.*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée au département de biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Badji Mokhtar Annaba sous la direction de professeur Ladjama A.*

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier en tout premier lieu ma directrice de thèse, madame. Djeghri-Hocine. B., Professeur à l'école nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral Alger, pour son encadrement rigoureux et méthodique et les compétences dont elle m'a fait bénéficier au long de toute ma formation*

*Mes vives reconnaissances vont également*

*A madame Chettibi H, professeur (UBMA), pour avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce travail.*

*A monsieur Merad T, maître de conférences (UBMA), pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*A monsieur Mechai A, maître de conférences (Université de Tebessa), pour avoir accepté de participer au jury et contribuer à l'examination de ce travail.*

*Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements à professeur Kirane-Gacemi D, responsable de la formation doctorale, pour son aide précieuse et ses innombrables services. Qu'elle soit assurée de mon éternelle et profonde reconnaissance.*

*Je tiens également à remercier professeur Boukhemis M, pour tout ce quelle m'a prodigué comme conseils et encouragements.*

*Je tiens à remercier infiniment monsieur Branes Z, professeur et chef de département de Biochimie et monsieur Ladjama A, professeur et directeur du laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée à l'université Badji Mokhtar Annaba.*

*Mes reconnaissances vont également à Mme. MECHAKRA A, Professeur à l'université Mentouri Constantine pour le soutien scientifique dans le domaine de plan d'expériences.*

*Je souhaite également remercier Mr Karam N, professeur à l'université d'Es Senia. Oran et Mr Amrane A, professeur à l'école nationale supérieure de chimie de Rennes. France pour la fourniture de souches de bactéries lactiques.*

*Je dois un grand merci à mes chères doctorantes Zineb, Aicha, Zahra, Samia, Kaouthar, Kelthoum, Marwa, Wided, Amina, pour nos délires, nos fous rires, nos moments de bonheur et de déprime qu'on a partagé pendant ces années.*

*Je tiens à remercier ma chère copine Sabrina qui a été toujours là pour me soutenir dans mes galères, me remonter le moral et m'encourager durant ces années de Doctorat.*

*Je souhaite également remercier le personnel du département de biochimie à commencer par le bibliothécaire Nawri et les techniciens :Lazhar, Bochra, Adra, Sakina, Saida, Mouna, Nadjwa et Mohamed qui permettent un formidable environnement de travail.*

*Un immense merci à ma très chère mère, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte.*

*Enfin, je remercie mes frères, mes sœurs et mes neveux pour leur soutien au cours de ces années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui.*

*Que toutes les personnes que j'ai oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et mes remerciements distingués.*

## Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre 1 : Les bactéries lactiques .....	3
1. Définition et caractéristiques générales.....	3
2. Classification .....	3
3. Métabolisme et caractères nutritionnels .....	8
3.1. Métabolisme carboné.....	8
3.2. Métabolisme des protéines .....	10
3.3. Importance des matières azotées non protéiques : (en anglais, NPN, non <i>protein nitrogen</i> ) .....	11
3.4. Métabolisme du citrate.....	11
3.5. Métabolisme du pyruvate.....	13
3.6. Exigences en vitamines.....	13
3.7. Exigences et influence des minéraux.....	13
4. Paramètres influençant la croissance des bactéries lactiques .....	14
4.1. Le pH .....	14
4.2. La température.....	14
4.3. Le potentiel redox.....	15
5. Rôles des bactéries lactiques .....	15
5.1. Rôles dans le domaine alimentaire .....	15
5.2. Rôles en bioremédiation .....	15
5.3. Rôles probiotiques des bactéries lactiques.....	15
Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques .....	19
1. Définition d'un milieu de culture.....	19
2. Classification des milieux de culture .....	19
3. Critères de choix d'un milieu de culture .....	20
4. Composition d'un milieu de culture.....	21
4.1. Sources de carbone .....	21

4.2. Sources d'azote.....	21
4.3. Vitamines .....	22
4.4. Autres besoins nutritionnels .....	22
5. Milieux de culture spécifiques à la flore lactique .....	23
5.1. Le lait .....	23
5.2. Le lactosérum .....	24
5.3. Milieux commerciaux .....	26
5.4. Autres milieux .....	32
Chapitre 3 : le lupin .....	33
1. Classification .....	33
2. Origine et distribution géographique .....	33
3. Utilisation .....	34
3.1. En alimentation humaine et animale.....	34
3.2. Comme engrais vert.....	34
3.3. En industrie .....	34
3.4. Phytoremédiation.....	35
4. Composition.....	35
4.1. Composition en acide aminé de <i>Lupinus albus</i> .....	35
4.2. Composition en sucres .....	36
4.3. Composition en vitamines du groupe B.....	38
4.4. Composition en sels minéraux .....	38
4.5. Composition en acides gras.....	39
Matériel et méthodes .....	40
1. Matériel .....	40
1.1. Souches .....	40
1.2. Milieux.....	40
2. Méthodes .....	41

2.1. Inoculum et conditions de culture .....	41
2.2. Mise au point du milieu pour la croissance des lactobacilles .....	42
2.3. Méthodes analytiques .....	43
2.4. Etudes statistiques.....	48
2.5. Mesure de la croissance bactérienne.....	51
2.6. Cinétique de croissance des Lactobacilles .....	52
Résultats et discussion .....	53
1. Mise au point du milieu de culture pour la croissance des lactobacilles.....	53
2. Composition de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin .....	54
3. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	55
3.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB).55	
3.2. Détermination des optima par le plan composite centré (PCC) .....	57
3.3. Validation du modèle.....	61
3.4. Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	62
4. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	63
4.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB).....	63
4.2. Détermination des optima par le plan composite centré.....	66
4.3. Validation du modèle.....	72
4.4. Cinétiques de la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	73
5. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	74
5.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB) .74	
5.2. Détermination des optima par le plan composite centré.....	77
5.3. Validation du modèle.....	83
5.4. Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	84
6. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	85

6.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)	85
6.2. Détermination des optima par le plan composite centré.....	88
6.3. Validation du modèle.....	94
6.4. Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	95
7. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> .....	106
7.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)	106
7.2. Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> sur milieux HLL, HLL-lactulose et MRS .....	109
Conclusion .....	113

## Liste des abbreviations

APT: All Purpose-Agar with Tween

BHIYE: Brain Heart Infusion Yeast Extract-Agar

BL : bactéries lactiques

EPLL : extrait protéique de lupin et lactosérum

FAO : Food and Agriculture Organization : organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

GRAS: Generally Recognized As Safe

HLL : hydrolysate de lactosérum et de lupin

HLLNT : hydrolysate de lactosérum et de lupin, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, tween

HLLT : hydrolysate de lactosérum et de lupin, tween

LLPW : Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella*

LSD: LS-DifferentialI-Agar

Milieu MRS : milieu de Man, Rogosa et Sharpe

MBM: Methylene Blue Milk Medium

NPN: non protein nitrogen

OFR : oligosaccharides de la famille de raffinose

OMS : organisation mondiale de la santé

PB : Plackett et Burman

PCC : plan composite centré

TPPY: Tryptose-Proteose P-Yeast extract--Eriochrome-Agar

UFC : unité formant colonie

## Liste des figures

Figure I. 1: La fermentation des carbohydres chez les bactéries lactiques.....	9
Figure I. 2: Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques .....	12
Figure I. 3: Position phylogénétique simplifiée du genre <i>Lupinus</i> au sein des Fabaceae. ....	33
Figure II. 1: Les différentes étapes de la préparation de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin .....	43
Figure III. 1: évaluation de la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> sur les milieux formulés....	53
Figure III. 2: évaluation de la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur les milieux formulés .....	53
Figure III. 3: a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> montrant l'interaction entre le tween 80 et le taux d'inoculum. ....	60
Figure III. 4: Diagramme d'optimisation montrant l'effet de tween 80 et du taux d'inoculum sur la croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	61
Figure III. 5 : Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> sur milieux MRS et HLLT 1 .....	62
Figure III. 6: Diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	65
Figure III. 7: a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> montrant l'interaction entre le $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et le tween 80. ....	69
Figure III. 8: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> montrant l'interaction entre le tween 80 et la vitesse d'agitation. ....	70
Figure III. 9: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> montrant l'interaction entre le $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et la vitesse d'agitation.....	71
Figure III. 10: Diagramme d'optimisation montrant l'effet du $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , du tween 80 et de la vitesse d'agitation sur la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	72
Figure III. 11: Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> sur milieux MRS et HLLNT1. ....	73
Figure III. 12: Diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	76
Figure III. 13: a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> montrant l'interaction entre le $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et le tween 80. ....	80
Figure III. 14: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> montrant l'interaction entre le tween 80 et la vitesse d'agitation ....	81

Figure III. 15: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> montrant l'interaction entre le $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et la vitesse d'agitation. .82	.82
Figure III. 16: Diagramme d'optimisation montrant l'effet du $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , du tween 80 et de la vitesse d'agitation sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> . ....83	83
Figure III. 17: Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur milieux MRS et HLLNT 2. ....84	84
Figure III. 18: Diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....87	87
Figure III. 19: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> montrant l'interaction entre la vitesse d'agitation et le tween 80....91	91
Figure III. 20: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> montrant l'interaction entre le tween 80 et le pH .....92	92
Figure III. 21: a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> montrant l'interaction entre la vitesse d'agitation et le pH.....93	93
Figure III. 22: Diagramme d'optimisation montrant l'effet de la vitesse d'agitation, du tween 80 et du pH sur la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....94	94
Figure III. 23: Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sur milieux MRS et HLLT 2 .....95	95
Figure III. 24: Diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> . ....108	108
Figure III. 25: Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> sur milieux HLL, HLL-lactulose et MRS. ....109	109

## Liste des tableaux

Tableau I. 1: Caractères différentiels des bactéries lactiques .....	4
Tableau I. 2: Composition des groupes phylogénétiques du genre <i>Lactobacillus</i> .....	7
Tableau I. 3: Les microorganismes utilisés comme probiotiques et leurs effets bénéfiques documentés par les essais cliniques humains.....	17
Tableau I. 4: Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production de ferments lactiques.....	23
Tableau I. 5: Composition de différents types de lactosérum.....	25
Tableau I. 6: Milieux électifs pour la croissance des bactéries lactiques .....	27
Tableau I. 7: Milieux sélectifs pour les lactobacilles et les genres apparentés (groupe LLPW) .....	29
Tableau I. 8: Exemples de méthodes de culture pour l'identification et le dénombrement de souches probiotiques.....	31
Tableau I. 9: Composition chimique de 100 g de <i>Lupinus albus</i> .....	35
Tableau I. 10: Composition en acides aminés de <i>Lupinus albus</i> .....	36
Tableau I. 11: Teneur en glucides solubles de 06 variétés de <i>Lupinus albus</i> .....	37
Tableau I. 12: Teneur de <i>Lupinus albus</i> en vitamines du groupe B.....	38
Tableau I. 13: Teneur en sels minéraux de <i>Lupinus albus</i> (mg/100g de matière sèche).....	38
Tableau I. 14: Composition de <i>Lupinus albus</i> en acides gras (% en huiles) .....	39
Tableau II. 1: Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes utilisés pour <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	49
Tableau II. 2: Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes employées pour <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . 50	
Tableau II. 3: Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes utilisées pour <i>Lactobacillus farciminis</i> . .....	50
Tableau III. 1: Composition moyenne de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin .....	54
Tableau III. 2: Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les valeurs de la densité optique (la réponse). .....	55
Tableau III. 3: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lactobacillus fermentum</i> . .....	56
Tableau III. 4: Résultats de la densité optique de <i>Lactobacillus fermentum</i> selon le plan composite centré de Box et Wilson. ....	58

Tableau III. 5: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	58
Tableau III. 6: Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les valeurs du dénombrement exprimées en log UFC/ml (la réponse).....	63
Tableau III. 7: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	64
Tableau III. 8: Résultats du dénombrement de <i>Lactobacillus brevis</i> selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	66
Tableau III. 9: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lactobacillus brevis</i> .....	67
Tableau III. 10: Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).....	74
Tableau III. 11: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	75
Tableau III. 12: Résultats du dénombrement de <i>Lactobacillus plantarum</i> selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	77
Tableau III. 13: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	78
Tableau III. 14: Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).....	85
Tableau III. 15: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	86
Tableau III. 16: Résultats du dénombrement de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> selon le plan composite centré de Box et Wilson.....	88
Tableau III. 17: Analyse statistique des résultats du plan composite centré de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	89
Tableau III. 18: Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).....	106
Tableau III. 19: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de <i>Lactobacillus farciminis</i> .....	107



# **Introduction**

# Introduction

---

## Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes industriellement importants reconnus par leur capacité fermentaire de contribuer à l'amélioration de la saveur, la texture et la biopréservation des matières premières périssables comme le lait, la viande et les légumes (Panini et *al.*, 2005; Georgiva et *al.*, 2009; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010).

Elles sont également connues par leurs divers effets bénéfiques tels que l'activité antitumorale, la réduction du cholestérol sérique, l'atténuation de l'intolérance au lactose, la stimulation du système immunitaire, l'amélioration de la résistance contre les agents pathogènes et la prévention de la diarrhée des voyageurs (Lee et Lee, 2008).

Toutefois, leur croissance nécessite des milieux complexes et riches, contenant des sources complexes d'azote (peptides), des sources de carbone, des vitamines et des minéraux qui doivent être fournis à des concentrations optimales (Djeghri et *al.*, 2010). Les milieux commerciaux comme le MRS résolvent le problème de sources de protéines, par des produits tels que la bactopectone, la tryptone, les extraits de viande ou de levure (parfois les deux) dans leur formulation. Ce dernier atteint des coûts élevés (Vázquez et Murado, 2008) et réduit par conséquent la rentabilité de la culture des BL à grande échelle, pour la production de biomasse probiotique ou de bactériocines (Vázquez et *al.*, 2008). Par conséquent, il serait primordial de réduire le coût des milieux de culture en utilisant des composants à faible coût (Juárez Tomás et *al.*, 2010) et des déchets.

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie du fromage disposé souvent sous forme de déchet de la pâte et provoque une contamination environnementale élevée car il affecte la structure physique et chimique du sol, ce qui entraîne une diminution du rendement des cultures, et lorsqu'il est rejeté dans les masses d'eau, il réduit la vie aquatique en épuisant l'oxygène dissous (Panesar et *al.*, 2007; Pescuma et *al.*, 2008; Rodríguez-Carrio et *al.*, 2014).

En raison de sa composition, il constitue un bon substrat qui peut être utilisé dans divers procédés biotechnologiques. Parmi ces utilisations la fermentation par les BL. Cependant, les BL ont une activité nettement inférieure dans le lactosérum en comparaison avec le lait, ce qui peut être expliqué par les quantités de nutriments significativement faibles présentes dans le lactosérum, qui sont nécessaires pour la croissance des BL, qui exigent des milieux très riches en nutriments (Bulatović et *al.*, 2014).

## Introduction

---

Le lupin est une plante économiquement précieuse qui pousse dans des différents sols et climats. Il est cultivé pour l'alimentation des ruminants, comme engrais vert qui contribue à améliorer la structure du sol et qui a une forte capacité de fixer l'azote. Il est également utilisé pour l'alimentation humaine en raison de sa forte teneur en protéines et en huiles (Dervas et *al.*, 1999 ; Erbas et *al.*, 2004 ; Guelwicz et *al.*, 2008).

Les objectifs de ce travail sont :

- I- Evaluer l'utilisation potentielle des composants du lactosérum et de protéines de lupin en tant que nutriments moins coûteux dans la formulation de milieux de culture pour la croissance des BL.
- II- Optimiser les paramètres physiques et nutritionnels pour la croissance de quatre lactobacilles en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (1946) et le plan composite centré de Box et Wilson (1951).
- III- Etudier l'effet de l'ajout de sources de carbone potentiellement prébiotiques sur la croissance d'une souche probiotique de *Lactobacillus farciminis* pour former des combinaisons symbiotiques.
- IV- Comparer la croissance des souches testées cultivées sur les milieux formulés avec celle sur MRS (milieu de laboratoire standard).



**I      Revue Bibliographique**

## Chapitre 1 : les bactéries lactiques

### 1. Définition et caractéristiques générales

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène qui réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce processus de fermentation est qualifié d'homofermentation si l'acide lactique représente le seul métabolite produit ou d'hétérofermentation si la fermentation des sucres produit d'autres métabolites comme le CO<sub>2</sub>, l'acétate ou l'éthanol. Elles présentent d'autres caractéristiques qui expliquent leur regroupement : Elles sont Gram-positif et catalase négative, anaérobies, micro-aérophiles ou aéro-tolérantes. Elles sont généralement non mobiles, non sporulantes et très rarement pathogènes. Les bactéries lactiques possèdent en effet un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoigne de leur parfaite innocuité (Canteri, 1997 ; Mayo et *al.*, 2010).

Sous l'appellation « bactéries lactiques » sont regroupés les genres : *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (appartenant à l'ordre des *Lactobacillales*, contenu de l'ADN en G + C < 50%) et le genre *Bifidobacterium* (appartenant à l'ordre des *Bifidobacteriales*, contenu de l'ADN en G + C > 50%) (Novel, 1993 ; Pilet et *al.*, 1998 ; Dacosta, 2000).

Les bactéries lactiques colonisent des habitats variés mais riches en composés organiques comme les produits alimentaires (les produits laitiers, la viande, les légumes, le vin) et les surfaces de muqueuses humaines telles que la cavité buccale, le vagin et le tractus gastro-intestinal (Hayek et Ibrahim., 2013).

### 2. Classification

Les bactéries lactiques ont été classées pour la première fois par Orla-Jensen en 1919 selon leur métabolisme. Leur classification vient d'être totalement revue et simplifiée, compte tenu des apports modernes de la taxonomie moléculaire. Actuellement, les bactéries lactiques regroupent 12 genres bactériens représentés au tableau I-1 avec les principaux caractères différentiels des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

## Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

Tableau I-1: Caractères différentiels des bactéries lactiques (Larpent, 2000 ; Axelsson, 2004).

Caractères	Bacilles		Cocci								
	Cb	Lb	Ae	Ec	Lc,Vg	Ln	Oen	Pc	Sc	Tc	W
Formation de tétrades	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à 6.5% Na Cl	ND	+/-	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	+/-
Croissance à 18% Na cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L,	L,	L	D, DL

*Cb = Carnobacterium*

*Lc = Lactococcus*

*Oe = Oenococcus*

*Tc = Tetragenococcus*

*Lb = Lactobacillus*

*Vg = Vagococcus*

*Pc = Pediococcus*

*W = Weissella*

*Ae = Aerococcus*

*Ln = Leuconostoc*

*Sc = Streptococcus*

*Ec = Enterococcus*

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

## ➤ Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901. Les espèces de ce genre se présentent sous forme de bâtonnets longs mais parfois, elles sont presque coccoïdes ; disposées en courtes chaînes. Leurs colonies sont parfois pigmentées en rouges brique. Ils sont souvent auxotrophes (vitamines, acide aminés) et aérotoles (Larpent, 2000 ; Pot, 2008). Leur métabolisme est fermentaire et saccharolytique, ne liquéfient pas la gélatine. Elles sont indole -, H<sub>2</sub>S -, caséine -, Leur croissance est augmentée par le CO<sub>2</sub> à la concentration de 5-10 % (Larpent, 2000).

Le genre *Lactobacillus* est ubiquitaire, ses espèces parmi les taxons les plus importants qui sont impliqués dans la microbiologie alimentaire et la nutrition humaine. Elles sont rencontrées également dans le tractus gastro-intestinal juste après la naissance. Chez l'homme en bonne santé, les lactobacilles sont normalement présents dans la cavité buccale (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC/ g), dans l'iléon (10<sup>3</sup> -10<sup>7</sup> UFC/ g) et dans le colon (10<sup>4</sup> à 10<sup>8</sup> UFC / g) et ils sont des micro-organismes dominants dans le vagin (Bernardeau et al., 2008 ; Salvetti et al., 2012).

Le genre « *Lactobacillus* » peut être scindé en 3 groupes (Larpent, 2000) :

\* **Le groupe I** : est formé de lactobacilles homofermentaires strictes contenant des espèces du groupe *Thermobacterium* et d'autres espèces nouvellement décrites.

Ces bactéries se développent à 45°C, mais pas à 15 °C, elles fermentent les hexoses presque totalement en acide lactique, elles possèdent une fructose 1-6 diphosphate aldolase et une phosphofructokinase. Les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades. Parmi les espèces de ce groupe : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii* (Novel, 1993 ; Pilet et al., 1998 ; Larpent, 2000 ).

\* **Le groupe II** : est formé du genre de « *Streptobacterium* » et de nouvelles espèces. Il contient les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs. Ils fermentent aussi les hexoses en acide lactique, par la voie d'Embden Meyeroff mais les pentoses sont dégradés en acide lactique, acétique et CO<sub>2</sub> par une phosphocétolase inductible.

## Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

Ces bactéries ont une forte activité fructose 1-6-diphosphate aldolase, une glucose-6-P et une 6-P gluconate déshydrogénase. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments. Ce groupe est très hétérogène formé par 3 complexes d'espèces centrées respectivement sur : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* et le groupe *Lactobacillus sake*-*Lactobacillus curvatus*-*Lactobacillus bavaricus* (Novel, 1993 ; Larpent, 2000).

\* **Le groupe III** : Anciennement appelé « *Betabacterium* » renferme les lactobacilles hétérofermentaires strictes. Il n'y a pas de fructose 1-6-di-P-aldolase, ni de phosphofructokinase mais ils ont une forte activité glucose-6-P gluconate déshydrogénase. Ils fermentent le gluconate et les pentoses. Ils fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique, éthanol et en gaz carbonique. Cette production de gaz carbonique à partir des hexoses est la caractéristique principale de ces micro-organismes. Leurs cellules sont courtes droites et séparées. Les espèces types sont *Lactobacillus bifermens*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefir*, et *Lactobacillus sanfrancisco*. De nouvelles espèces sont définies *Lb. uli*, *Lb. rimae* et *Lb. Paralimentarius* (Novel, 1993 ; Larpent, 2000).

Pour des raisons pratiques, ces trois groupes physiologiques sont toujours maintenus. Cependant, cette classification phénotypique a été trouvée considérablement différente de la structure phylogénétique du genre. Collins et *al.*, (1991a) ont distingué trois groupes phylogénétiques : groupe de *Lactobacillus delbrueckii*, groupe *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* et le groupe de *Leuconostoc*, par la suite, ils ont reclassé certaines espèces de *Lactobacillus* dans les genres *leuconostoc* et *Wissela* ce qui a réduit l'hétérogénéité du genre *Lactobacillus* (Pot, 2008).

La description massive de nouvelles espèces au cours des 20 dernières années a conduit à une révision progressive du genre avec la reconnaissance d'un nombre croissant de groupes phylogénétiques variables. Bien que l'analyse des séquences de ARNr 16S a contribué au développement d'une taxonomie plus exhaustive pour les lactobacilles, il est devenu évident que seulement une faible corrélation existe entre la classification traditionnelle basée sur les propriétés métaboliques et de la parenté phylogénétique. L'analyse taxonomique récente du genre *Lactobacillus* rapporté par Salvetti et *al.* (2012) est censée d'être un outil utile pour les applications et la communication scientifique liées à des lactobacilles (Tableau I-2).

## Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

Tableau I-2 : composition des groupes phylogénétiques du genre *Lactobacillus* (Salvetti et al., 2012).

Groupes	Espèces
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acetotolerans, L. acidophilus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. amylotrophicus, L. amylovorus, L. crispatus, L. delbrueckii, L. equicursoris, L. fornicalis, L. gallinarum, L. gasseri, L. gigeriorum, L. hamsteri, L. helveticus, L. hominis, L. iners, L. intestinalis, L. jensenii, L. johnsonii, L. kalixensis, L. kefiranofaciens, L. kitasatonis, L. pasteurii, L. psittaci, L. taiwanensis, L. ultunensis</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>acidipiscis, L. agilis, L. animalis, L. apodemi, L. aquaticus, L. aviarius, L. cacaonum, L. capillatus, L. ceti, L. equi, L. ghanensis, L. hayakitensis, L. hordei, L. mali, L. murinus, L. nagelii, L. oeni, L. pobuzihi, L. ruminis, L. saerimneri, L. salivarius, L. sucicola, L. satsumensis, L. uvarum, L. vini</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>L. alvi, L. antri, L. coleohominis, L. fermentum, L. frumenti, L. equigenerosi, L. gastricus, L. ingluviei, L. mucosae, L. oris, L. panis, L. pontis, L. reuteri, L. secaliphilus, L. vaginalis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri, L. dioliovorans, L. farraginis, L. hilgardii, L. kefiri, L. kisonensis, L. otakiensis, L. parabuchneri, L. parafarraginis, L. parakefiri, L. rapi, L. sunkii</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. alimentarius, L. crustorum, L. farciminis, L. futsaii, L. kimchiensis, L. mindensis, L. nantensis, L. nodensis, L. paralimentarius, L. tuceti, L. versmoldensis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. acidifarinae, L. brevis, L. hammersii, L. koreensis, L. namurensis, L. parabrevis, L. paucivorans, L. senmaizukei, L. spicheri, L. zymae</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. collinoides, L. kimchicus, L. odoratitofui, L. paracollinoides, L. similis</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. florum, L. fructivorans, L. homohiochii, L. lindneri, L. sanfranciscensis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. fabifermentans, L. paraplantarum, L. pentosus, L. plantarum, L. xiangfangensis</i>
<i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus, L. fuchuensis, L. graminis, L. sakei</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. bif fermentans, L. coryniformis, L. rennini</i>
<i>L. manihotivorans</i>	<i>L. manihotivorans, L. nasuensis, L. porcinae</i>
<i>L. perolens</i>	<i>L. harbinensis, L. perolens, L. shenzhenensis</i>
<i>L. vaccinofermentans</i>	<i>L. oligofermentans, L. suebicus, L. vaccinofermentans</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici, P. argentiniensis, P. cellicola, P. clausenii, P. damnosus, P. ethanolidurans, P. inopinatus, P. lolii, P. parvulus, P. pentosaceus, P. siamensis, P. stilesii</i>
Couples	<i>L. kunkeei-L. ozensis L. rossiae-L. siliginis L. concavus-L. dextrinicus L. pantheris-L. thailandensis</i>
Espèces individuelles	<i>L. algidus, L. brantae, L. camelliae, L. composti, L. floricola, L. malefermentans, L. saniviri, L. selangorensis, L. senioris, L. sharpeae</i>

## 3. Métabolisme et caractères nutritionnels

Les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement exigeants en nutriments car elles ont une faible aptitude biosynthétique. Et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de l'environnement, aussi elles nécessitent pour leur croissance la fourniture exogène d'un sucre fermentescible, des acides aminés des bases nucléotidiques et de plusieurs vitamines (Desmazeaux, 1983a ; De Roissart, 1986 ; Novel, 1993 ; Monnet et *al.*, 2008).

### 3.1. Métabolisme carboné

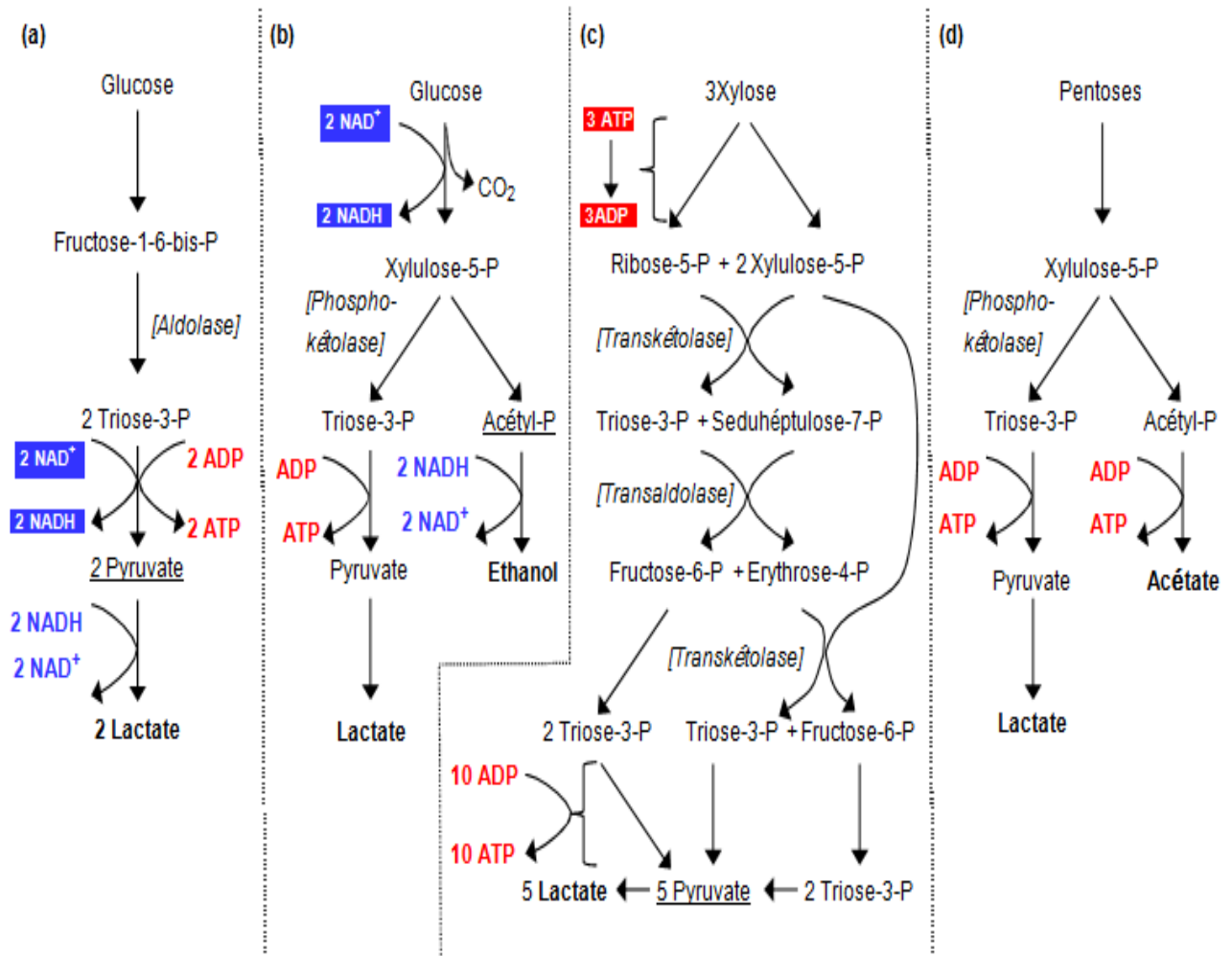
Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose).

La capacité à métaboliser les sucres est souvent fonction des souches. Cette faculté peut être liée à un plasmide, telle que la fermentescibilité du lactose chez *Lactococcus lactis*, ou au contrainte associée au chromosome. Le catabolisme du sucre fournit l'énergie nécessaire à l'anabolisme sous forme d'ATP et génère des coenzymes réduits sous forme de NADH essentiellement (Monnet et *al.*, 2008).

En effet, les bactéries lactiques ne sont capables de cataboliser qu'un nombre plutôt réduit de sources de carbone, et *via* des voies métaboliques relativement simples : la voie homofermentaire et la voie hétérofermentaire (Monnet et *al.*, 2008 ; Hayek et Ibrahim., 2013). (figure I-1).

Les BL homofermentaires métabolisent une molécule d'hexose tels que le glucose à deux molécules d'acide lactique et deux molécules d'ATP, ce qui donne plus de 85% d'acide lactique à partir d'une molécule de glucose. Les BL hétérofermentaires produisent seulement 50% d'acide lactique en fermentant une molécule de glucose en une molécule d'acide lactique, une molécule d'éthanol / acétate, une molécule de CO<sub>2</sub> et une seule molécule d'ATP (Hayek et Ibrahim., 2013)

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques



- (a) Métabolisme homofermentaire des hexoses *via* la voie d'Emden–Meyerhoff ;
- (b) Métabolisme hétérofermentaire des hexoses *via* la phosphokétolase ;
- (c) Métabolisme homofermentaire des pentoses *via* la voie pentose phosphate ;
- (d) Métabolisme hétérofermentaire des pentoses *via* la voie phosphokétolase.

Figure I-1 : la fermentation des carbohydrates chez les bactéries lactiques (Gänzle, 2015).

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

## 3.2. Métabolisme des protéines

Les bactéries lactiques exigent la fourniture exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont pour la plupart incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple et elles sont des auxotrophes pour ces acides aminés. Ces derniers sont utilisés directement par le biais de transporteurs spécifiques et la perméation de la plupart des acides aminés dépend de la force motrice protonique ((Desmazeaud, 1983a ; Novel, 1993 ; Juillard et *al*, 1996 ; Monnet et *al.*, 2008).

Après l'utilisation des acides aminés, les bactéries lactiques utilisent les peptides et les protéines comme source azotée pour réaliser la fermentation lactique. Le lait de vache, par exemple, contient 30 à 35 g/Kg de protéines dont 90% de différentes caséines :  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  dans les proportions : 4 :1 :3 :1 sous formes de micelles sensibles à la protéolyse (Novel, 1993). Cependant, elles ne peuvent pas traverser la membrane cytoplasmique et utilisé par la bactérie, car ils ont une taille moléculaire élevée, et c'est pour cette raison qu'elles doivent être au préalable hydrolysées par :

- des protéases liées aux parois et/ou ;
- des systèmes protéolytiques extracellulaires ou liés aux enveloppes bactériennes (Desmazeaud, 1983a ; Novel, 1993 ; Monnet et *al.*, 2008 ; Hayek et Ibrahim., 2013).

Les acides aminés et les oligopeptides provenant de la dégradation enzymatiques sont importés dans le cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique par différents systèmes de transport. Dans le cytoplasme, les peptides sont dégradés en acides aminés par d'autre peptidases et par la suite utilisés dans les voies cataboliques ou biosynthétiques de la bactérie. (Juillard et *al*, 1996). Par conséquent, les bactéries lactiques dépendent d'un système protéolytique pleinement actif pour répondre à leurs besoins en acides aminés. Les composants protéolytiques des bactéries lactiques sont parmi les mieux caractérisés à nos jours, non seulement en raison de leur impact sur la physiologie des bactéries lactiques, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans le développement de la texture et la saveur des produits laitiers (Mayo et *al.* , 2010).

Ces sont les streptocoques du groupe N qui ont été les mieux caractérisés pour leur système protéolytique, ils possèdent en particulier des protéinases extracellulaires liées aux

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

parois. Par ailleurs, chez les lactobacilles, les activités protéolytiques sont très diversifiées quant à leur nature et à leur niveau d'activité. Ceci est vrai au niveau des espèces comme au niveau des souches d'une même espèce (Desmazeaud, 1983 ; Monnet *et al.*, 2008).

Une analyse récente de génome des bactéries lactiques a contribué à une caractérisation complète du système protéolytique des espèces séquencées.

Le génome de *Lb. plantarum* est le seul qui code pour des enzymes pour la biosynthèse de tous les acides aminés, à l'exception de la leucine, l'isoleucine et la valine. En revanche, *Lb. acidophilus* est susceptible d'être auxotrophe pour 14 acides aminés, et *Lb. johnsonii* semble incapable de synthétiser la plupart, si ce n'est pas la totalité des acides aminés (Mayo *et al.*, 2010).

### **3.3. Importance des matières azotées non protéiques : (en anglais, NPN, non *protein nitrogen*)**

Ces composés sont des corps solubles dans l'acide trichloracétique à 12% et représentent 5 à 7% de l'azote total du lait. Ces composés sont importants pour la fermentation lactique, car en raison de leur poids moléculaires ; ils peuvent être absorbés directement sans subir de transformation préalable et utilisé par la bactérie. Cette catégorie regroupe : les acides aminés et les peptides de faible poids moléculaire (comportant moins de huit résidus), la vitamine du groupe B, l'urée qui présente en raison de 0.25 g/l dans le lait, elle peut être dégradée par les streptocoques thermophiles et le gaz carbonique produit voire même l'ammoniac, utilisés dans les cultures en association par certains lactobacilles notamment *L.bulgaricus*. Les bases azotées: (créatine, ammoniacque....) qui stimulent la croissance des *S.lactis* et *L. lactis* (Desmazeaud, 1990 ; Desmazeaud, 1997).

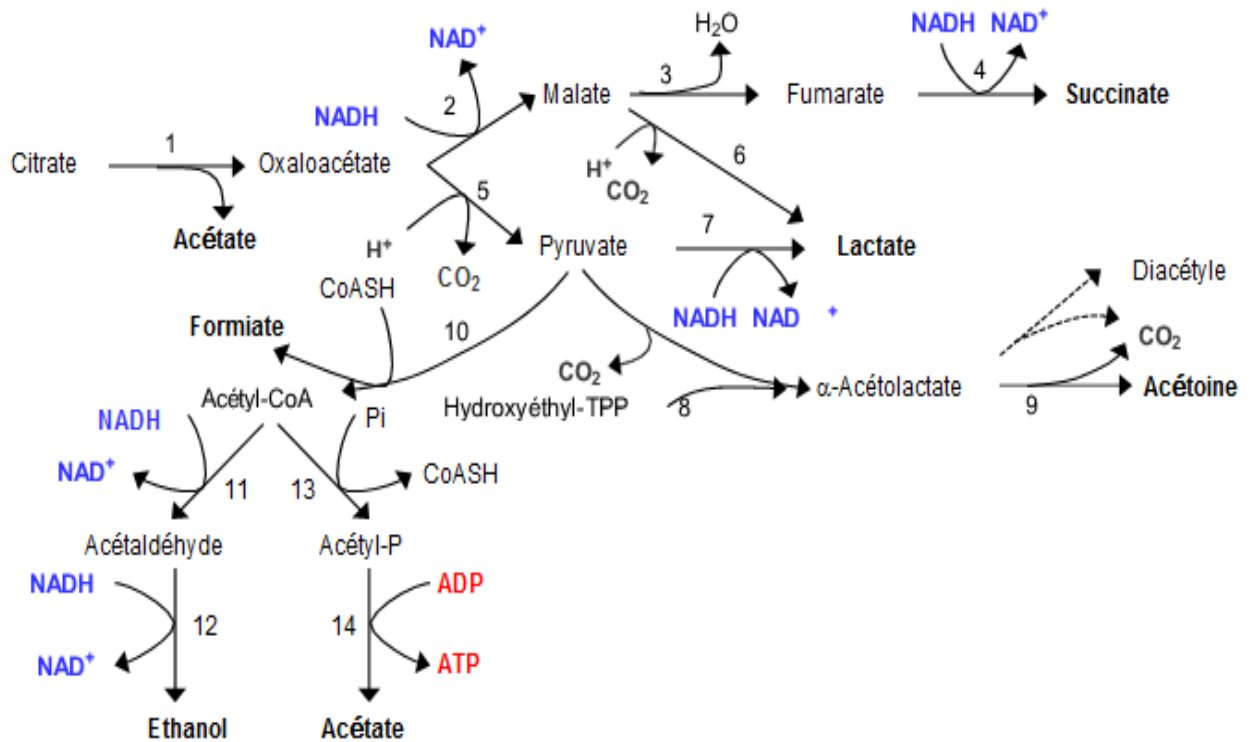
### **3.4. Métabolisme du citrate**

le citrate est un précurseur du diacétyl, de l'acétaldéhyde, de l'acétate et du CO<sub>2</sub> qui sont les principaux responsables de l'arôme des produits laitiers frais (beurre, fromage frais, crème fraîche (Bekal *et al.*, 2009 ; Mayo *et al.*, 2010) (figure I-2).

En effet, Le citrate présent en faible concentration dans le lait (environ 1,7 mg/ml), n'est pas utilisé par les bactéries lactiques comme source d'énergie, bien qu'il favorise leur croissance, mais son métabolisme ne peut être effectué qu'en présence d'un sucre fermentescible comme source d'énergie (De Roissart, 1986).

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate perméase où il sera métabolisé (Novel, 1993 ; Monnet *et al.*, 2008 ).



1, citrate lyase; 2, malate déshydrogénase; 3, fumarate hydratase; 4, succinate déshydrogénase; 5, oxaloacétate décarboxylase; 6, enzyme malolactique; 7, lactate déshydrogénase; 8, acétolactate synthase; 9, acétolactate décarboxylase; 10, pyruvate formiate lyase; 11, acétaldéhyde déshydrogénase; 12, alcool déshydrogénase; 13, phosphotransacétylase; 14, acétate kinase.

Figure I-2 : le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques (Gänzle, 2015).

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

## 3.5. Métabolisme du pyruvate

Le pyruvate qui provient de la glycolyse ou du métabolisme des acides aminés et des citrates est utilisé par les bactéries lactiques pour produire de l'acide lactique ou d'autres produits tel que : l'éthanol, l'acétate et des composés aromatiques : diacétyl, acétoine (Mayo et *al.*, 2010 ; ).

Une partie du pyruvate participe à la synthèse d'un composé bactérien de nature probablement lipidique qui explique l'action stimulante du citrate sur la croissance de *Streptococcus diacetylactis*. Une autre partie est décarboxylée pour former avec de la thiamine-pyrophosphate (TPP) un complexe acétaldéhyde-TPP et du CO<sub>2</sub>. Sous l'action d'une acétolactate-synthase, ce complexe peut réagir avec une autre molécule de pyruvate pour former de l'acétolactate très instable qui, par décarboxylation, donne naissance soit à du diacétyl (réaction spontanée en anaérobiose). Le complexe acétaldéhyde-TPP peut d'autre part réagir avec de l'acétyl-CoA et produire directement du diacétyl (en anaérobiose) par une diacétyl-synthase. Le diacétyl peut être transformé irréversiblement en acéto-butane-diol sous l'action d'une acétoine-réductase, mais de façon réversible et limitée (De Roissart, 1986).

## 3.6. Exigences en vitamines

Les bactéries lactiques exigent certaines vitamines car elles ont un rôle dans leur croissance et interviennent dans la synthèse de certains produits par exemple les lactocoques exigent la biotine (H) qui agit avec le CO<sub>2</sub> en formant de l'acide aspartique et de certains acides gras. Les streptocoques thermophiles ont une exigence absolue en acide pantothénique (B5) et en riboflavines (B2) tandis que leur croissance est stimulée par la thiamine (B1), la niacine (PP), la biotine et la pyridoxine. Alors que toutes les espèces de lactobacilles présentent une exigence absolue pour la vitamine B5 et la B2 (Desmazeaud, 1990).

## 3.7. Exigences et influence des minéraux

Les principaux minéraux exigés par les bactéries lactiques sont :

**Le magnésium :** est le principal cation bivalent présent dans la cellule. Il a de multiples fonctions, parmi lesquelles le rôle de cofacteur de réactions enzymatiques et la participation à la stabilisation des acides nucléiques. Sa présence dans les milieux de culture est donc

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

indispensable, dans le lait qui contient de 100 à 150 mg/L de magnésium, il a été observé que l'addition de 25 à 50 mg/L de ce dernier stimule la croissance de *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*. Cet ion serait indispensable pour la croissance de *Lb. helveticus* et essentiel pour celle de *Lb. lactis* et *Lb. delbrueckii* (Desmazeaud, 1992 ; Hayek et Ibrahim., 2013).

**Le manganèse :** fortement concentré par *Lb. plantarum*, le manganèse sert à la résistance de cette espèce au superoxyde. Divers espèces de *Leuconosoc* et tous les lactobacilles sont exigeants au  $Mn^{++}$ . Ce dernier est nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes dont l'ARN polymérase, la LDH, l'acide malolactique la NADH oxydase (Novel, 1993 ; Hayek et Ibrahim., 2013).

**La présence du fer :** Le fer transporté par plusieurs molécules très affines n'a pas d'action générale ni sur la croissance ni sur la production d'acide lactique (Boyaval, 1989).

**Le potassium :** joue un rôle important dans le contrôle du pH intracellulaire, Cet ion est exigé pour la croissance de *Lb. helveticus* , *E. faecalis* et *Lb. casei* (Desmazeaud, 1992).

## 4. Paramètres influençant la croissance des bactéries lactiques

### 4.1. Le pH

Le pH est l'un des éléments physiologiques les plus importants qui influent sur la croissance des bactéries lactiques, car un pH bas ne diminue pas seulement la vitesse de croissance mais il altère également la viabilité des cellules.

Chez les lactocoques et les streptocoques thermophiles, la croissance est fortement diminuée à un pH inférieur à 5 et arrêtée à un pH inférieur à 4,5. Alors, les bactéries lactiques doivent être aptes à maintenir à un pH voisin de la neutralité durant la croissance car elles sont fortement productrices du lactate (Canteri, 1997).

### 4.2. La température

Chez les principales bactéries lactiques utilisées en industrie laitière, les températures extrêmes d'activité sont comprises entre 0° et 52°C. Quant aux températures optimales

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

d'activité sont comprises entre 22° et 45°C selon l'espèce bactérienne. La température optimale de croissance est généralement inférieure à la température optimale de la production d'acide lactique mais supérieure à la température préconisée pour la production de bactériocines (Béal, 1989 ., Béal et *al.*, 2008).

## 4.3. Le potentiel redox

Le potentiel d'oxydoréduction du milieu influence la croissance et la survie des bactéries. Elles sont des germes micro aérophiles, et ne tolèrent que de faible quantité d'oxygène et par conséquent un faible potentiel redox (Canteri, 1997). Différentes études ont montré que les bactéries lactiques manifestent une activité réductrice (Béal et *al.*, 2008).

## 5. Rôles des bactéries lactiques

### 5.1. Rôles dans le domaine alimentaire

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la préservation des aliments par la production d'acide lactique, de bactériocines et de substances inhibitrices ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurelles et organoleptiques par l'acidification, la sécrétion d'exopolysaccharides et les composés responsables des saveurs caractéristiques du beurre et du yaourt tels que le diacétyl et l'acétyldéhyde (Pilet et *al.*, 1998).

### 5.2. Rôles en bioremédiation

Plus récemment, les bactéries lactiques ont été appliquées pour éliminer les métaux lourds, y compris le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et l'arsenic (As), ainsi que l'aflatoxine B1 de l'eau contaminée (Elsanhoty et *al.*, 2016).

### 5.3. Rôles probiotiques des bactéries lactiques

#### 5.3.1. Définitions

Définition d'un probiotique

Selon la définition adoptée actuellement par la FAO / OMS « Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (Carminati et *al.*, 2010).

# Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

Les bactéries lactiques et les bifidobactéries sont les microorganismes les plus utilisés comme probiotiques, mais certaines levures et bacilles peuvent être également utilisés (tableau I-3). Les probiotiques sont consommés couramment dans le cadre d'aliments fermentés avec des cultures vivantes actives ajoutées, comme dans le yaourt et le yaourt de soja, ou comme compléments alimentaires (Otiento, 2011).

## Définition d'un prébiotique

Le concept d'un prébiotique a été introduit par Gibson et Roberfroid. (1995) : un ingrédient alimentaire non digestible exerçant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement dans le colon la croissance et/ou l'activité des ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte.

Un symbiotique est une combinaison synergique d'un probiotique et prébiotique, qui exerce un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces apportées sous forme de compléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal par la stimulation de la croissance et / ou en activant le métabolisme des ou d'un nombre limité de bactéries bénéfiques pour la santé, et par conséquent le bien-être de l'hôte (O'Grady et Gibson., 2005 ; Kojima et *al.*, 2016).

## 5.3.2. Effets bénéfiques associés aux probiotiques

Les effets bénéfiques revendiqués concernent principalement la régulation du transit (réduction des diarrhées ou de la constipation), la stimulation de marqueurs de l'immunité et la réduction des symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn et la colite ulcéreuse). Les probiotiques peuvent être également utiles dans la prévention et le traitement de certains types de cancer. (Rochat et Langella, 2009 ; Cavalheiro et *al.*, 2015) (tableau I-3).

## Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

Tableau I-3: Les microorganismes utilisés comme probiotiques et leurs effets bénéfiques documentés par les essais cliniques humains (Ouwehand et *al.*, 2002).

Genre	Espèce	Exemple de souche	Effets bénéfiques	Référence
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Réduction de diarrhée associée aux antibiotiques.	Black et <i>al.</i> 1991
	<i>casei</i>	Shirota	Diminution de la diarrhée à rotavirus. Réduction de la récurrence du cancer superficiel de la vessie. Immunomodulation.	Sugita et Togawa, 1994 Aso et <i>al.</i> 1995 Nagao et <i>al.</i> 2000
	<i>johnsonii</i>	La1	Amélioration de vaccination orale Réduction de la colonisation par <i>Helicobacter pylori</i>	Link-Amster et <i>al.</i> 1994 Felley et <i>al.</i> 2001
	<i>plantarum</i>	299v	Réduction du syndrome du côlon nerveux. Réduction du Cholestérol LDL.	Niedzielin et <i>al.</i> 2001 Bukowska et <i>al.</i> 1998
	<i>reuteri</i>	SD2112	Diminution de la diarrhée à rotavirus.	Shornikova et <i>al.</i> 1997
	<i>rhamnosus</i>	GG	Diminution de la diarrhée à rotavirus.  Immunomodulation. Soulagement des maladies inflammatoires de l'intestin Traitement et prévention des allergies.	Guandalini et <i>al.</i> 2000 Kaila et <i>al.</i> 1992 Gupta et <i>al.</i> 2000  Kalliomäki et <i>al.</i> 2001b; Majamaa & Isolauri 1997
	<i>salivarius</i>	UCC118	Réduction des symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin.	Mattila-Sandholm et <i>al.</i> 1999

## Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

---

Tableau I-3: Les microorganismes utilisés comme probiotiques et leurs effets bénéfiques documentés par les essais cliniques humains (Ouwehand et *al.*, 2002) (suite).

<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Réduction du syndrome du côlon nerveux.	Brigidi et <i>al.</i> 2001
	<i>lactis</i>	Bb12	Traitement des allergies Raccourcissement de la diarrhée à rotavirus. Réduction de l'incidence de la diarrhée du voyageur. Amélioration de la vaccination orale.	Isolauri et <i>al.</i> 2001 Saavedra et <i>al.</i> 1994 Black et <i>al.</i> 1989 Link-Amster et <i>al.</i> 1994

## Chapitre 2 : les milieux de cultures des bactéries lactiques

### 1. Définition d'un milieu de culture

Un milieu de culture est une préparation d'éléments nutritifs, de sels minéraux, éventuellement d'autres composés, soit sous forme liquide, ou sous forme solide qui permet le développement, la conservation, l'isolement et la sélection des microorganismes.

La solidification d'un milieu de culture est obtenue par adjonction au milieu liquide du gélose ou agar-agar à la concentration de 0,5 à 4% (Guiraud, 2003).

Pour être efficace, le milieu de culture doit contenir tous les nutriments exigés pour la croissance du microorganisme. Bien que tous les micro-organismes ont besoin de sources d'énergie, le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre, et de divers minéraux, la composition précise d'un milieu satisfaisant dépendra des espèces que l'on cherche à cultiver parce que les besoins nutritionnels varient considérablement entre les microorganismes, cependant, la connaissance de l'habitat du micro-organisme à cultiver est souvent utile dans le choix d'un milieu de culture approprié vu que ses besoins en nutriments reflètent son environnement naturel (Willey et *al.*, 2008).

### 2. Classification des milieux de culture

Les milieux de culture peuvent être classés en fonction de leur utilisation en trois classes :

- **Milieux sélectifs** : ce sont des milieux qui permettent la croissance des microorganismes que l'on recherche en inhibant le développement des autres germes, ces milieux contiennent donc des agents sélectifs que l'on appelle encore des inhibiteurs.
- **Milieux d'enrichissement** : on parle des milieux d'enrichissement pour désigner certains milieux liquides qui contiennent des agents sélectifs et qui sont destinés à enrichir le milieu en germe recherché.
- **Milieux d'isolement et d'identification** : les milieux sélectifs solides sont utilisés pour l'isolement des espèces, et il existe d'autres milieux appelés milieux d'identification parce qu'ils servent à mettre en évidence une ou plusieurs propriétés chez un microorganisme précédemment isolé (Meyer et *al.*, 2004).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

### 3. Critères de choix d'un milieu de culture

Les choix des composants sont dictés à la fois par les besoins nutritionnels des microorganismes et par le type de la production ultérieure. Ils doivent prendre en considération certaines caractéristiques physico-chimiques :

**Solubilité thermique :** les protéines sont plus ou moins sensibles à la dénaturation thermique, certaines étant thermolabiles. En outre, des phénomènes de réaction de Maillard peuvent se produire entre sucres réducteurs et acides aminés provoquant ainsi la disparition d'acides aminés basiques tels que la lysine, l'histidine ou l'arginine;

**Filtrabilité :** le choix des composants est limité lorsque le procédé de fermentation continue avec extraction est retenu. En effet, certains composants insolubles des milieux complexes ; protéines insolubilisées du lactosérum, polysaccharides ; peuvent colmater les systèmes de microfiltration ou d'ultrafiltration;

**Pouvoir tampon du milieu :** cette caractéristique a été longtemps essentielle mais, depuis la généralisation des procédures de régulation du pH, elle est devenue secondaire.

A ces caractéristiques physico-chimiques, il importe d'associer des critères de qualité et de sécurité :

**Innocuité pour le consommateur :** l'incorporation, dans les milieux de culture, de molécules non autorisées à la consommation est interdite;

**Absence d'inhibiteurs de la croissance des bactéries :** par exemple, dans le cas du lait, la présence d'antibiotiques et de désinfectants, ainsi que la qualité microbiologique doivent être systématiquement vérifiées;

**Prise en compte des effets des composants des milieux sur la conservation ultérieure des cellules.**

Enfin, le respect des exigences réglementaires et la prise en compte des demandes des consommateurs contraignent le choix de certaines matières premières notamment lors de l'élaboration de produits particuliers, par exemple : absence de matières premières d'origine animale : crise de l'encéphalite spongiforme bovine : de glutamate, de lactose ou en cas de spécification kasher ou halal (Béal et *al.*, 2008).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

### 4. Composition d'un milieu de culture

#### 4.1. Sources de carbone

Les glucides sont la principale source d'énergie pour la croissance bactérienne. Les BL métabolisent les glucides en différents composés utiles (principalement l'acide lactique) par le processus commun de fermentation. Plusieurs ingrédients complexes comme le lait écrémé ou le lactosérum, entrent généralement dans les milieux de culture de BL pour satisfaire leurs besoins carbonés, cependant des ingrédients de composition simple comme le lactose ou le glucose ou d'autres mono- ou disaccharides peuvent être également utilisés comme source de carbone (Béal et *al.*, 2008 ; Hayek et Ibrahim, 2013).

#### 4.2. Sources d'azote

Les besoins en azote des BL sont complexes et variables. Si ces bactéries sont toutes incapables d'assimiler l'azote minéral, leur besoin en azote organique, dépendent fortement de leur équipement enzymatique (activités protéasique et peptidasique). L'addition d'une source d'azote facilement assimilable est donc généralement souhaitable pour activer leur croissance (Béal et *al.*, 2008), parmi les sources d'azote les plus utilisés :

**L'extrait de levure :** Ces extraits, commercialisés sous forme déshydratée, sont préparés à partir de levures de boulangerie ou de brasserie. Ils sont utilisés comme source d'acides aminés et vitamines hydrosolubles (Vitamine B).

**L'extrait de viande :** est le produit d'une infusion de viande de bœuf, filtrée puis concentrée

Il contient des substances solubles dans l'eau : glucides, composés azotés, vitamines hydrosolubles, sels minéraux, dont on ignore la nature et l'importance.

**Les peptones :** résultent de la digestion chimique ou enzymatique de matières protéiques telles que la viande, la caséine, la gélatine. Suivant le degré de dégradation, elles contiennent des polypeptides, des tripeptides, des dipeptides et des acides aminés. On distingue deux grandes variétés de peptones.

**La peptone pepsique :** est obtenue par l'action de la pepsine en milieu très acide à la température de 50 C environ durant 12 à 14 heures. Elle contient surtout des protéines de poids moléculaire élevé, quelques oligopeptides et très peu d'acides aminés.

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

**La peptone trypsique :** résulte de l'action du suc pancréatique (ensemble des enzymes protéolytiques extraits de la pulpe de pancréas) en milieu carbonaté, à pH 7,8, à la température de 50-55 °C durant 2 à 6 heures. Elle est constituée d'un mélange d'oligopeptides et de nombreux acides aminés libres. La substance protéique la plus couramment utilisée est la viande de bœuf préalablement dégraissée. D'autres variétés de peptones sont encore commercialisées : la peptone pancréatique provenant de l'action de la pancréatine, un mélange de trois familles d'enzymes (lipase, amylase et trypsine) ; la peptone papainique obtenue grâce à la papaine, une protéinase stricte extraite du latex de *Carica papaya*.

**Les hydrolysats :** ce sont des peptones obtenues par une action inorganique (acide chlorhydrique par exemple) sur des protéines (Leclerk, 1975 ; Delarras, 2007).

### 4.3. Vitamines

Les besoins en vitamines des principales espèces de BL sont détaillés dans le chapitre 1. Pratiquement, ils sont le plus souvent satisfaits lors de l'utilisation d'ingrédients complexes tels que le lactosérum, le lait ou les extraits de levure. Lorsque des sucres simples sont utilisés, ils doivent impérativement être additionnés d'une source d'azote complexe (Béal et *al.*, 2008).

### 4.4. Autres besoins nutritionnels

D'autres facteurs de croissance tels que les minéraux et le tween 80 doivent être apportés aux milieux de culture pour stimuler la croissance des BL (Béal et *al.*, 2008).

Le tableau 1-4 rassemble les principaux composants qui entrent dans la composition de ces milieux, au regard de leur rôle pour les micro-organismes

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

Tableaux 1-4: Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production de ferments lactiques (Béal et *al*, 2008).

Rôle des composants	ingrédients
Sources de carbone	monosaccharides
	disaccharides
	lactosérum
	Lait écrémé
Sources d'azote	Concentrés protéiques de lactosérum
	Hydrolysats protéiques de lactosérum
	Hydrolysats de caséine
	Extraits de levures
	Peptones de levures
	Peptones d'origine animale ou végétale : soja :
Vitamines et facteurs de croissance	Acide ascorbique
	tween
	Vitamines du groupe B
Sels minéraux	Sels de Ca, Mg, Mn, NH <sub>4</sub>
Sels à pouvoir tampon	Sels de K, Na , NH <sub>3</sub>
Antimousses	Tween
	Monoglycérides acétylés
	Antimousses avec ou sans silicone

### 5. Milieux de culture spécifiques à la flore lactique

#### 5.1. Le lait

Le lait contient tous les éléments essentiels à la croissance des bactéries, mais pas toujours en quantité suffisante, notamment pour la fraction azotée non protéique, par exemple une simple addition d'extrait de levure stimule la production d'acide, et par conséquent il n'est pas un milieu de culture optimale pour la croissance des bactéries lactiques. D'autre part, on a constaté, depuis longtemps, des variations journalières et saisonnières importantes dans

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

l'activité e la fermentation lactique, indépendamment de toute action inhibitrice due aux bactériophages ou aux antibiotiques.

Cependant, avec une teneur initiale en lactose de l'ordre de 50g/L, il satisfait largement les besoins carbonés des bactéries. Ainsi, à la fin d'une production de ferment, il reste une teneur en lactose résiduel comprise entre 0 et 20g/L, selon le microorganisme et les conditions employées (Desmazeaud, 1990 ; Beal et *al.*, 2008).

### 5.2. Le lactosérum

Le lactosérum est un coproduit de l'industrie fromagère, d'un coût raisonnable. C'est un liquide translucide qui se sépare du caillée après la coagulation du lait, avant ou pendant la production du fromage. Sa composition est variable selon le type de produit dont il est issu, selon le producteur, mais aussi selon la période de l'année (Beal et *al.*, 2008).

Les lactosérums sont divisés en deux groupes selon leurs origines : les lactosérums doux, provenant de la production de fromages coagulés par la présure, et les lactosérums acides, provenant de fromages acides (comme le cottage) ou de la fabrication de la caséine. Les lactosérums acides sont généralement acides sont en général plus difficile à sécher à cause de la plus forte minéralisation et de la présence d'acide lactique (Vignola, 2002).

Le lactosérum contient principalement du lactose (70 à 75%) et des protéines sériques (lactalbumine et globuline : 10 à 13%) mais aussi du calcium (4,5g/L) et des vitamines (thiamine, pyridoxine et riboflavine) (tableau I-5). Cependant l'utilisation du lactosérum est une pratique ancienne mais peu employée. Divers raisons expliquent le peu d'utilisation du lactosérum seul pour la production de ferments :

Comme le lactosérum n'a pas un pouvoir tampon très élevé, si aucun contrôle du pH n'est effectué il y a un potentiel de lésion cellulaire par suracidification. Ceci provoque une phase de latence accrue lors de l'inoculation dans le lait, et une faible activité initiale de ces ferments et par conséquent, l'utilisation des fermentations avec contrôle externe de pH est adoptée. Lors de ces fermentations, de la base (ammoniacque, KOH) est constamment ajoutée en milieu afin de neutraliser l'acidité produite par les bactéries lactiques et ainsi maintenir le pH à un niveau élevé (Champagne et Arora, 2009).

La présence de protéines sériques qui précipitent lors du traitement thermique, nécessitent ainsi une étape de séparation. Pour y remédier, il est possible de réaliser une hydrolyse

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

enzymatique de la fraction protéique, en faisant agir de la trypsine pendant 4 heures à 37°C, de la papaine pendant 20 min à 65°C ou une protéase (Béal et *al.*, 2008).

Tableau I-5: composition de différents types de lactosérum (Jeantet et *al.*, 2008).

	Lactosérum doux			Lactosérum acide		Microfiltrat
	Emmental	St-Paulin Edam	Camembert	Pâte fraîche	Caséine	
Extrait sec en %	6,5	5,00	6,50	6,00	6,00	6,40
pH	6,70	6,50	6,10	6,10	4,60	6,65
En % d'extrait sec						
Lactose	76,00	75,00	75,00	65,5	65,5	78,00
Protéines	13,50	13,50	13,00	12,00	12,00	12,00
Cendres	8,00	8,50	9,00	12,00	12,00	8,00
Acide lactique	1,80	2,00	2,20	10,00	1,80	1,80
Matière grasse <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,00
Calcium	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80	0,60
Phosphore	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50	0,60
Chlorure (NaCl)	2,50	2,50	2,50	2,50	7,50	2,50

1. Après écrémage.

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

### 5.3. Milieux de laboratoire

#### 5.3.1. Milieux électifs pour la croissance des bactéries lactiques

APT (Milieu Agar Peptone Tween) est un exemple d'un milieu classique pour la croissance des bactéries lactiques. Il a été initialement développé par Evans et Niven (1951) pour l'isolement des lactobacilles à partir des produits de charcuterie. Il est encore couramment utilisé pour l'isolement et la culture des BL à partir de produits à base de viande (tableau I-6).

Le Jus de tomate a été trouvé pour stimuler la croissance d'un grand nombre BL et il a été inclus dans l'agar Briggs (Briggs, 1953), un milieu fréquemment utilisé pour la culture des lactobacilles du lait et des produits laitiers.

Le Milieu MRS a une composition semblable à APT, il a été développé principalement dans le but de substituer le jus de tomate par les facteurs de croissance définis tel que  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (De Man et *al.*, 1960). Il est probablement le milieu plus couramment utilisé pour la culture des lactobacilles et d'autres BL. Reuter (1970) a modifié le milieu MRS en fonction des besoins nutritionnels spécifiques des BL de viande en milieu appelé LA agar. (Schillinger et Holzapfel, 2012).

Le milieu BHIYE (Brain Heart Infusion Yeast Extract-Agar) a été également utilisé pour la culture des bactéries lactiques de viande. D'autres milieux peuvent également être utilisés, tels que la gélose de dénombrement avec extrait de levure, dextrose et tween ajoutés. Le milieu RCM (Reinforced Clostridium agar) peut être adapté pour une utilisation avec des bactéries lactiques si un hydrate de carbone tel que le dextrose ou le lactose 1% est ajouté (pour les streptocoques lactiques).

TPPY (Tryptose-P roteose P-Yeast extract-Eriochrome-Agar) et le LSD (LS-Differential-Agar) sont des milieux qui permettent une bonne croissance et une différenciation des bactéries lactiques dans les yaourts par l'addition de Eriochrome ou TTC (chlorure de triphényltétrazolium). Cela semble très utile pour la séparation quantitative de la microflore de yaourt qui était précédemment difficile (Reuter, 1985).

Le milieu M 17 a été développé pour permettre une meilleure croissance des streptocoques lactiques due à l'incorporation du 1.9%  $\beta$ -disodium glycerophosphate (GP) qui a un pouvoir tampon suffisant pour maintenir le pH au-dessus de 5,7 même après 24 heures à 30°C (Terzaghi et Sandine, 1975).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

Tableau I-6 : Milieux électifs pour la croissance des bactéries lactiques (Reuter, 1985 ; Schillinger et Holzapfel, 2012).

Milieux	Groupe d'espèces cultivées	Application	Référence
APT (pH 6,7) All Purpose-Agar with Tween	BL	charcuterie /générale	Evans et Niven. (1951)
Briggs (pH 6,8) jus de tomate-Agar	BL	produits laitiers, flore lactique intestinale, générale	Briggs. (1953)
MRS (pH 6.2) de Man, Rogosa et Sharpe-Agar	BL	Générale, viande	De Man et <i>al.</i> (1960)
La (pH 6.8) Lactobacillus-Agar	BL	générale	Reuter. (1970)
TPPY (pH 6.8) Tryptose-P roteose P-Yeast extract-Eriochrome-Agar	lactobacilli, <i>S.thermophilus</i>	yaourt	Braquart. (1981)
M 17 (pH 7.2) Acide ascorbique, di-sodium-Glycerophosphate	lactobacilli, <i>S.thermophilus</i>	yaourt	Terzaghi et Sandine. (1975)
LSD (pH 6.1) = LS-Differential-Agar	lactobacilli, lactococci	yaourt	Eloy et Lacrosse (1976)
BHIYE = Brain Heart Infusion Yeast Extract-Agar	BL	viandes	Baird et Patterson, 1980

### 5.3.2. Milieux sélectifs pour les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques et apparentés ont des exigences nutritionnelles, par conséquent l'étude de leurs propriétés physiologiques et biochimiques nécessitent des milieux de culture complexes et riches mais aussi capables d'induire ou de mettre en évidence les propriétés spécifiques des souches bactériennes étudiées (De Roissard et Luquet, 1994).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

### 5.3.2.1. Milieux sélectifs pour les lactobacilles

Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella* (Groupe LLPW) sont des microorganismes physiologiquement similaires, qui partagent souvent le même habitat et montrent des besoins de croissance relativement similaires.

Par conséquent, il est difficile de développer un milieu sélectif qui permet l'isolement de, par exemple, les lactobacilles en présence de *Leuconostoc* ou *Weissella*. D'autre part, des différences marquées existent entre les espèces au sein de chacun de ces genres vis-à-vis de la tolérance aux baisses de pH, de l'acide, aérobie / anaérobie et des composés inhibiteurs (Schillinger et Holzapfel, 2012).

Par exemple, le milieu MRS a été modifié de plusieurs manières pour obtenir une sélectivité pour certains ou pour l'ensemble des groupes lactiques. Une modification de pH a été apportée (pH 5,5) mais ça n'a pas montré une sélectivité entière. Une autre modification envisagée par l'ISO recommande un pH de 5,7 avec de l'acide ascorbique. La concentration optimale doit être prouvée. Autres modifications contenaient 0,1% d'acétate de thallium à un pH de 6,5 ou 5,5, mais ils ne sont pas totalement sélectifs (Reuter, 1985).

Le tableau I-7 résume les milieux sélectifs les plus importants utilisés pour les lactobacilles et genres apparentés (LLPW). Il n'y a pas actuellement un milieu complètement sélectif disponible pour le genre *Lactobacillus*. La majorité des milieux conçus pour l'isolement des lactobacilles permettent la croissance simultanée de *Leuconostoc* et / ou *pediococcus* et des souches représentantes de *Weissella* (Schillinger et Holzapfel, 2012).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

Tableau I-7 : Milieux sélectifs pour les lactobacilles et les genres apparentés (groupe LLPW) (Schillinger et Holzappel, 2012).

Milieu	Application	Groupes d'espèces à cultiver	Inhibiteur/ indicateur	Référence
Rogosa (pH 5.5)	générale	<i>lactobacilli</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>	acétate, acide acétique	Rogosa et <i>al.</i> (1951)
NAP (pH 5.5)	viande	<i>lactobacilli</i> , <i>lactococci</i> , ( <i>Leuconostoc</i> )	nitrite, actidione, polymyxin B	Davidson et Cronin. (1973)
MRS (pH 5.5)	générale, viandes	<i>lactobacilli</i> , <i>Weissella</i>	–	Baird et Patterson. (1980)
MRS-S (pH 5.7)	générale, viandes	<i>lactobacilli</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Weissella</i>	L'acide sorbique (0.1%)	Reuter (1985)
LaS (pH 5.0)	viandes	<i>lactobacilli</i> , ( <i>Leuconostoc</i> , <i>Weissella</i> )	L'acide sorbique (0.04%)	Reuter (1970)
HHD (pH 7.0)	Végétaux fermentés	BL homo- et hétérofermentaires	vert de bromocrésol	McDonald et <i>al.</i> (1987)
M 5 (pH 6.5)	vin	BL homo- et hétérofermentaires	vert de bromocrésol	Zu' niga et <i>al.</i> (1993)
TJA (pH 5.0)	vin	<i>lactobacilli</i> , <i>pediococci</i> , <i>Leuconostoc</i>	cycloheximide, L'acide sorbique	Yoshizumi (1975)
KPL (pH 5.5)	kefir	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Vin blanc	Toba et <i>al.</i> (1986)

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

---

### 5.3.2.2. Milieux sélectifs pour les streptocoques

Les streptocoques lactiques peuvent être cultivés sur un certain nombre de milieux de culture tels que la gélose semi-solides citrate lait, la gélose arginine tetrazolium, le bouillon extrait de viande (lemco) glucose, et le milieu d'Elliker. Ce dernier est employé dans l'industrie laitière pour la culture de démarrage de ces deux espèces importantes de, *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*. Cependant, ce milieu permet également la croissance des Lactobacilles. Une modification ultérieure de la gélose Elliker, appelée (yogurt lactic agar), est particulièrement utile dans la différenciation de *Lactobacillus bulgaricus* de *Streptococcus thermophilus*.

Le milieu lait bleu de méthylène (MBM) peut être utilisé pour différencier les entérocoques des streptocoques.

Afin de différencier *Streptococcus lactis* et *Streptococcus cremoris*, le milieu gélosé de Reddy fournit une différenciation fondée sur la couleur de la colonie (Carr et al., 2002).

### 5.3.2.3. Dénombrement des bactéries lactiques dans les produits laitiers

Le dénombrement d'une souche unique en utilisant un milieu sélectif est facilement réalisé, Cependant, avec la présence simultanée de plusieurs espèces (les levains lactiques et les bactéries probiotiques) dans un produit, partageant des caractéristiques culturelles similaires, il peut être difficile de parvenir à un dénombrement différentiel ou sélectif de colonies de chaque espèce.

Plusieurs milieux ont été développés pour le dénombrement sélectif de culture de yaourt (*Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *S. thermophilus*) en présence de souches probiotiques tels que *Bifidobacterium* (tableau I-8) (Davis, 2014).

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

Tableau I-8 : Exemples de méthodes de culture pour l'identification et le dénombrement de souches probiotiques (Davis, 2014).

Méthodes et milieux pour le dénombrement sélectif des souches probiotiques basés sur le technique des répliques				
Milieux	base	Sélectivité/ supplément	Notes	références
Bifidobacterium spp. Milieu sélectif pour les bodibobacterium (BSM)	MRS (deMan, Rogosa, Sharpe)	Cysteine HCl et mupurocine	Incubation à 37°C pendant 72h Des préoccupations concernant Le développement de <i>Staphulococcus aureus</i> résistant à la mupirocine	Leuschner et al. (2003), Upton et al. (2003), Simpson et al. (2004)
NPNL (Neomycine sulfate, paromycine, acide nalidixique, et chlorure de Lithium)	MRS ou BL (blood(sang)– liver (foie)– glucose)	sulfate de néomycine, sulfate de paromomycine, acide nalidixique et le chlorure de lithium	Lorsque L-cystéine n'est pas présent, <i>Bifidobacterium</i> ne pousse pas ou forme des colonies très fines; Beaucoup de temps pour préparer	Teraguchi et al. (1978), Dave et Shah. (1996)
Raffinose Bifidobacterium medium	LCL (liver (foie) – cysteine– lactose)	Propionate, chlorure de lithium, et raffinose	Milieu sans antibiotique Certaines souches de <i>B. bifidum</i> ne poussent pas bien sur ce milieu	Hartemink et al. (1996)
MRS-raffinose	MRS	Raffinose, chlorure de lithium (0.05%)	Incubation à 45 ° C spécifique pour le dénombrement de <i>B. lactis</i> BB12 LiCl inhibe <i>lactobacillus</i> Groupe de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> )	Tabasco et al. (2007)
MRS-clindamycine	MRS	Clindamycine	l'incubation en anaérobiose à 37 ° C pendant 72 h L'utilisation d'antibiotiques pour l'inhibition	ISO (2002), Van de Castele et al. (2006)

## Chapitre 2 : Les milieux de culture des bactéries lactiques

Tableau I-8 : Exemples de méthodes de culture pour l'identification et le dénombrement de souches probiotiques (Davis, 2014).

X-Glu	Rogosa agar	5-Bromo-4-3-indoyl- $\beta$ -Dglucopyrananoside	Visualisation de l'activité de $\beta$ -D glucosidase . Plus sélectif que le MRS et le Rogosa pour les produits de yogourt	Kneifel et Pacher (1993)
Groupe de <i>Lactobacillus casei</i> ( <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> ) MRS-salicin	MRS	Salicine	Des rapports contradictoires; Ne peut pas être utilisé dans les produits contenant <i>L. acidophilus</i>	Dave et Shah (1996), Ravula et Shah (1998)

### 5.4. Autres milieux

Plusieurs autres milieux de culture ont été développés pour la croissance et les activités métaboliques des BL afin de réduire le coût des milieux des BL précédemment cités.

La formulation de ces milieux est généralement basée sur l'utilisation de substrats à faible coût et des déchets d'industries. Parmi ces substrats : le pois cajan, les lentilles rouges, l'haricot urd (soja noir), le pois chiche, les grains d'haricot mungo, le soja et la levure de boulanger) ont été évalués pour leur potentiel de remplacer les sources d'azote commerciales coûteuses, les peptones et l'extrait de levure (Altaf et *al.*, 2005), les figes sèches et le pois cassé (Kassas et *al.*, 2015), le soja (Kwon et *al.*, 2000), le pois chiche (Djaghri et *al.*, 2007a), le jaune d'œuf délipidé et d'autolysat de levure au lactosérum déprotéiné (Djaghri et *al.*, 2007b), L'extrait de féverole (Djaghri et *al.*, 2006), les peptones de différentes fractions de viscères de morue (chevreuils, laitance, estomacs, et les résidus de foie) (Horn et *al.*, 2007), l'autolysat des intestins de poulet (Ahmed Gaid et *al.*, 2016), la poudre de perméat de lactosérum par la source azotée d'autolysat des bactéries lactiques (Amrane et *al.*, 2000), la liqueur de maïs (Yu et *al.*, 2008) et l'hydrolysat papinique de lactosérum ( Ziadi et *al.*, 2010).

## Chapitre 3 : le lupin

### 1. Classification

Le lupin blanc (*Lupinus albus*) est une plante herbacée annuelle, qui appartient au genre *Lupinus* à la sous-famille des légumineuses Papilionoideae (Faboideae) où il est classé parmi la tribu Genisteae (figure I-3) (Święcicki et al., 2015).

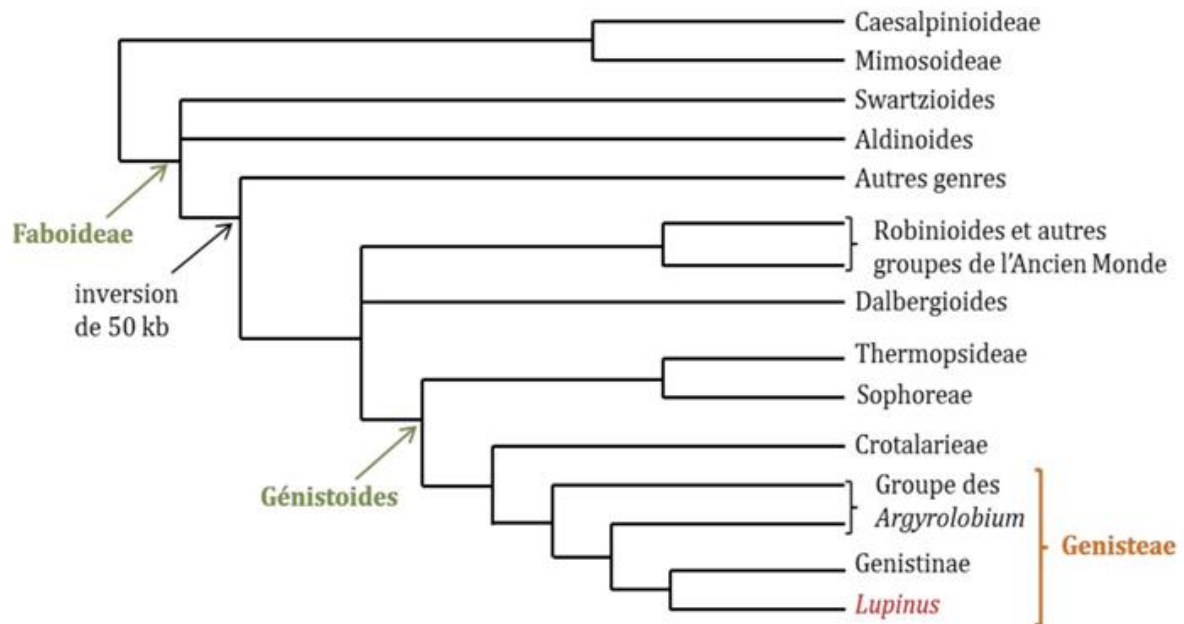


Figure I-3 : Position phylogénétique simplifiée du genre *Lupinus* au sein des Fabaceae, (d'après Aïnouche et Bayer, 1999 ; LPGW, 2013, Ferval, 2014).

### 2. Origine et distribution géographique

Le lupin est considéré d'avoir une origine polyploïde et se retrouve dans les deux mondes anciens et nouveaux (Nigussie, 2012), il est originaire de la région méditerranéenne et la région Amérique andine-Centrale. Ce genre contient de 200 à 500 espèces, trois espèces de ce genre (*L. albus* L. *L. luteus* L. et *L. angustifolius*) de la région méditerranéenne montrent une importance agricole (Aïnouche et Bayer, 1999 ; Gonza' lez-Andre's et al., 2007 ; Święcicki et al., 2015). Il est connu d'être cultivé depuis longtemps en Grèce, en Italie, en Egypte et à Chypre. Actuellement, il a presque disparu en Europe centrale alors qu'il est de plus en plus largement cultivé en Amériques. Aujourd'hui, il est une culture traditionnelle d'impulsion mineure, développée autour de la Méditerranée et la mer Noire et dans la vallée du Nil, étendant au Soudan et en Ethiopie. Il est aussi parfois cultivé ailleurs, par exemple, au Kenya,

## Chapitre 3 : Le lupin

---

en Tanzanie, au Zimbabwe, en Afrique du Sud, Maurice, États-Unis et en Amérique du Sud (principalement le Brésil et le Chili) (Nigussie, 2012).

### 3. Utilisations

Le Lupin blanc est une plante précieuse économiquement et en agriculture, il présente de multiples intérêts :

#### 3.1. En alimentation humaine et animale

Le lupin a été cultivé anciennement en raison de sa teneur élevée en protéines. Il constitue une source d'azote importante pour la nutrition humaine et du bétail. (Dervas *et al.*, 1999; Erbas *et al.*, 2005; Gulewicz *et al.*, 2008) Aujourd'hui, l'intérêt croissant de lupin dans les produits alimentaires se rapporte à ses bienfaits pour la santé humaine qui peuvent découler de profils protéiques et fibres uniques de lupins et des constituants mineurs de ses grains parmi ces effets : la santé de l'intestin grâce à ses prébiotiques, activité hypocholestérolémiante, réduction de la glycémie et de la réponse insulinaire, amélioration de la sécrétion d'insuline, contrôle de l'appétit (Sweetingham et Kingwell, 2008).

#### 3.2. Comme engrais vert

Le lupin contribue à l'amélioration de la structure du sol par l'augmentation de la teneur en matière organique et sa capacité d'accumuler l'azote et le phosphore dans les sols sablonneux pauvres grâce à sa capacité d'établir sur ses racines des symbioses avec des bactéries du genre *rhizobium* et *Ochrobactrum* (Erbas *et al.*, 2005 ; Trujillo *et al.*, 2005).

#### 3.3. En industrie

Les protéines de lupin sont utilisées dans les aliments sans gluten (produits de panification, cakes, biscuits, pâtes alimentaires).

La farine de lupin blanc est utilisée dans les produits de panification ou dans la fabrication de produits carnés pour ses propriétés de texture et de coloration. On produit notamment de la boisson végétale de lupin (« lait de lupin ») apprécié en mélange avec le « lait de soja » pour en diminuer l'amertume, mais aussi des ingrédients utilisés, comme ceux du pois, pour leurs propriétés techno-fonctionnelles en industrie agroalimentaire (Schneider *et al.*, 2015).

La farine de lupin a été également développée en pâtisserie grâce à ses propriétés émulsifiantes et sa couleur jaune permettant de remplacer l'œuf (Champ *et al.*, 2015).

La fraction d'huile de lupin blanc est actuellement incorporée dans les produits cosmétiques

## Chapitre 3 : Le lupin

(Sweetingham et Kingwell, 2008).

### 3.4. Phytoremédiation

Le lupin présente également d'intéressantes capacités de détoxification des sols contaminés par des métaux lourds (cadmium, arsénic) (va'zquez et *al.*, 2006) ou par des produits chimiques (Bonvallot, 2004).

### 4. Composition

Les graines de lupin blanc ont une teneur en protéines comprise entre 33% et 47%, selon le génotype et la localisation. Leur teneur en huile varie de 6% à 13% avec une concentration élevée en acides gras polyinsaturés (tableau I-9) (Erbas et *al.*, 2005).

Tableaux I-9 : composition chimique de 100 g de *Lupinus albus* (Mohamed et Rayas-duarte, 1995 ; Ballester et *al.*, 1980 ; Erbas *et al.*, 2005).

	Pourcentage (a)	Pourcentage (b)	Pourcentage (c)
Protéines	38%	34,4%	32,2%
huiles	10%	10,9	5,95%
fibres	/	11,7%	16,2%
Cendre	4%	3,2%	2,65%
Sucres totaux	48%	/	/

(a): Mohamed et Rayas-duarte, 1995 (b) : Ballester et al, 1980 (c) : Erbas *et al.*, 2005

#### 4.1. Composition en acides aminés de *Lupinus albus*

Les protéines de lupin contiennent une grande quantité d'arginine, d'acide aspartique d'acide glutamique. En revanche elles se caractérisent par un faible taux de méthionine (tableau I-10).

## Chapitre 3 : Le lupin

Tableau I-10 : Composition en acides aminés de (*Lupinus albus*) (Sgarbieri et Galeazzi, 1978 ; Ballester et *al*, 1980) <sup>c</sup>

Acide aminé	(a)	(b)
Lysine	4,90	4,26
Histidine	1,90	1,88
Arginine	9,60	10,30
Acide aspartique	14,20	9,45
Threonine	4,20	3,32
Serine	6,40	3,78
Acide glutamique	32,90	30,80
Proline	4,70	4,62
Glycine	4,30	3,26
Alanine	3,70	2,83
Cystine	traces	2,52
Methionine	0,60	0,70
Valine	4,50	3,70
Isoleucine	5,00	3,97
Leucine	9,20	6,90
tyrosine	3,80	4,40
Phenylalanine	3,30	3,65

a : Sgarbieri et Galeazzi, 1978

b : Ballester et *al*, 1980

c : Les concentrations d'acide aminé sont exprimées en grammes d'acide aminé / 16g d'azote

### 4.2. Composition en sucres

#### 4.2.1. Composition en amidon

Selon Mohamed et Rayas-duarte (1995) *Lupinus albus* L.2043N contient seulement 3% d'amidon, une teneur nettement plus faible en comparaison avec les valeurs rapportées pour les autres légumineuses.

#### 4.2.2. Composition en oligosaccharides

Les légumineuses sont une bonne source d'oligosaccharides, connu sous le nom  $\alpha$  galactosidases ou oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO), Les Lupins contiennent

## Chapitre 3 : Le lupin

une teneur élevée en  $\alpha$  galactoside de 7-15% et de 5,46-8,51% pour *Lupinus albus* (tableau I-11).

Tableau I-11 : teneur en glucides solubles de 06 variétés de *Lupinus albus* (Martínez-Villaluenga et Vidal-Valverde, 2005).

Variété de lupin	Saccharose (% d.m.)	Raffinose (% d.m.)	Stachyose (% d.m.)	Verbascose (% d.m.)	Total RFOsb(% d.m.)
<i>L. albus</i> cv. multolupa	2.58 ± 0.06	0.62 ± 0.03	5.74 ± 0.06	0.19 ± 0.10	7.56 ± 0.10
<i>L. albus</i> cv. marta	3.09 ± 0.08	0.33 ± 0.02	7.24 ± 0.11	0.94 ± 0.01	8.51 ± 0.13
<i>L. albus</i> LO-3844	2.16 ± 0.20	0.44 ± 0.03	7.26 ± 0.31	ND	7.71 ± 0.33
<i>L. albus</i> LO-3846	3.13 ± 0.06	0.54 ± 0.02	6.85 ± 0.03	ND	7.39 ± 0.03
<i>L. albus</i> LO-3848	2.41 ± 0.19	0.36 ± 0.02	5.71 ± 0.57	ND	6.07 ± 0.55
<i>L. albus</i> LO-3855	2.84 ± 0.09	0.48 ± 0.02	4.98 ± 0.22	ND	5.46 ± 0.24

a : écart type de la moyenne n= 04

b :RFOs = oligosaccharides de la famille de raffinose

## Chapitre 3 : Le lupin

### 4.3. Composition en vitamines du groupe B

La composition en vitamines du groupe B de *Lupinus albus* est rapportée par Erbas et al (2005) est présentée dans le tableau I-12

Tableau I-12 : Teneur de *Lupinus albus* en vitamines du groupe B (Erbas et al., 2005)

Vitamines <sup>a</sup>	Lupin <sup>b</sup>
Thiamine (B1)	3.9±0.2
Riboflavine (B2)	2.3±0.1
Niacine	39.1±1.1

<sup>a</sup> : Les données sont présentées sur la base de matière sèche (mg/kg).

<sup>b</sup> : écart-type de la moyenne n = 3.

### 4.4. Composition en sels minéraux

On se basant sur l'étude de Trugo et al (1993), la composition de *lupinus albus* en Mn est variable entre les trois variétés, Cependant il reste l'élément abondant dans les graines de lupin, en revanche le Cu existe en faible concentration (Tableau I-13).

Tableau I-13 : teneur en sels minéraux de *Lupinus albus* (mg/100g de matière sèche) (Trugo et al., 1993).

Type de lupin cultivé	Ca	Fe	Zn	Cu	Mn
<i>L. albus</i> Hallbitter	134	7.7	4.7	1.1	327
<i>L. albus</i> Vega T85	147	7.3	4.8	1.0	61.0
<i>L. albus</i> Kalina	198	3.5	4.5	0.8	139

## Chapitre 3 : Le lupin

---

### 4.5. Composition en acides gras

Le Lupin est composé essentiellement d'acides gras insaturés avec 86% de l'acide oléique et linoléique (Williams et McGibbon, 1980). La composition de *Lupinus albus* rapportée par Uzun et al. (2007) est représentée dans le tableau I-14.

Tableau I-14 : Composition de *Lupinus albus* en acides gras (% en huiles) (Uzun et al., 2007).

	Teneur en matière grasse	Acide palmitique	Acide stéarique	Acide oléique	Acide linoléique	Acide linoléinique
<i>L. albus</i>	10.7	7.6	1.5	47.6	20.3	9.2



## **II Matériel et Méthodes**

# Matériel et méthodes

---

## 1. Matériel

Le matériel utilisé est constitué de 5 lactobacilles et des milieux de culture : le milieu témoin (MRS) et ceux élaborés à partir du blé, blé germé, lupin, lupin germé, fenugrec et d'hydrolysat de lactosérum et de lupin.

### 1.1. Souches

*Lactobacillus brevis* CHTD27 et *Lactobacillus plantarum* BH14 isolées et identifiées par l'équipe de Karem N.E et Karem ZADI : Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Faculté des Sciences, Département de Biotechnologie, Université d'Es Senia. Oran. Algérie.

*Lactobacillus fermentum* DSM 20049 et *lactobacillus farciminis* DSM 20184 (souche probiotique) : souches lyophilisées de la collection de laboratoire DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) fournies par Pr Amrane : Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. France.

*Lactobacillus rhamnosus* : souche potentiellement probiotique, isolée des fèces de nourrissons sains et allaités, identifiée et caractérisée dans le cadre du projet de recherche ayant pour thème : « Isolement et caractérisation de souches autochtones de bactéries lactiques en vue de leur utilisation dans la fabrication de produits fermentés à effets probiotiques ».

### 1.2. Milieux

Le MRS milieu témoin, de marque Pronadisa, Conda S.A., Espagne, est utilisé selon les instructions du fabricant (annexe 1) et les différents milieux formulés.

## 2. Méthodes

### 2.1. Inoculum et conditions de culture

#### 2.1.1. Revivification et contrôles de la pureté des souches

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

#### 2.1.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé en transférant une colonie d'une souche pure dans 10 ml de bouillon MRS (Pronadisa, Conda S.A., Espagne) et incubé pendant 16 h à 37 ° C. La culture à densité optique DO<sub>600</sub> ajustée à 0,60 est utilisée pour inoculer les milieux de croissance.

#### 2.1.3. Etude de la morphologie et du Gram

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux groupes, les bactéries Gram positif se colorent en violet et les bactéries Gram négatif se colorant en rose. Elle permet aussi d'observer la morphologie et l'arrangement cellulaire (Delarras, 2014).

#### 2.1.4. Etude de la catalase

Elle permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation des protons issus des voies d'oxydation directe par l'oxygène de l'air. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est réparti ; un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Delarras, 2014).

### 2.2. Mise au point du milieu pour la croissance des lactobacilles

#### 2.2.1. Préparation des milieux à base de blé, blé germé, lupin, lupin germé et fenugrec

Tous les substrats (blé, blé germé, lupin, lupin germé et fenugrec) sont broyés dans un moulin à café. Les farines obtenues sont tamisées et stockées dans des bocaux en verre à 4°C.

50 g de farine est dissoute dans 450 ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 30 min, puis hydrolysé par voie enzymatique à pH 6 par la papaïne (50 mg / 450 ml) avec une agitation pendant 1 h à 55 ° C, ensuite le mélange est chauffé à 100 ° C pendant 20 min afin d'inactiver l'enzyme et centrifugé à 4000 tpm pendant 20 min. Le surnageant résultant est ajusté à pH 6,5 et utilisé comme milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*.

#### 2.2.2. Préparation du milieu à base de lactosérum et de lupin (Hanoune et al., 2015).

##### 2.2.2.1. Préparation d'extrait protéique de lupin et lactosérum

60 g de farine de lupin blanc (*Lupinus albus*) et le lactosérum en poudre reconstitué à 6% (p / v) sont ajoutés à 1000 ml d'eau distillée. La suspension résultante est agitée magnétiquement pendant 20 minutes après l'ajustement du pH initial à 9 afin de solubiliser les protéines de lupin, constitué essentiellement par les globulines insolubles dans l'eau au point isoélectrique (pI). Cependant, la plupart des protéines de lupin (85-95%) sont solubles à pH 9,0 (Chango et al., 1995). Le mélange est centrifugé à 4000 tpm pendant 20 min à température ambiante et le surnageant obtenu riche en protéines de lupin et en lactose est ajusté à pH 6.0 pour procéder à une hydrolyse enzymatique.

##### 2.2.2.2. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse de surnageant est effectuée à 55 ° C sous agitation horizontale à 100 tpm pendant 24 h après l'addition de 50 µg de papaïne dans le surnageant résultant. Le mélange est chauffé à 100 ° C pendant 20 min afin d'inactiver l'enzyme. Ensuite, le mélange est centrifugé à 4000 tpm pendant 20 min et le surnageant résultant est utilisé en tant que milieu de base de lupin et de lactosérum (hydrolysate de lactosérum et de lupin HLL) (Figure II-1).

## Matériel et méthodes

---

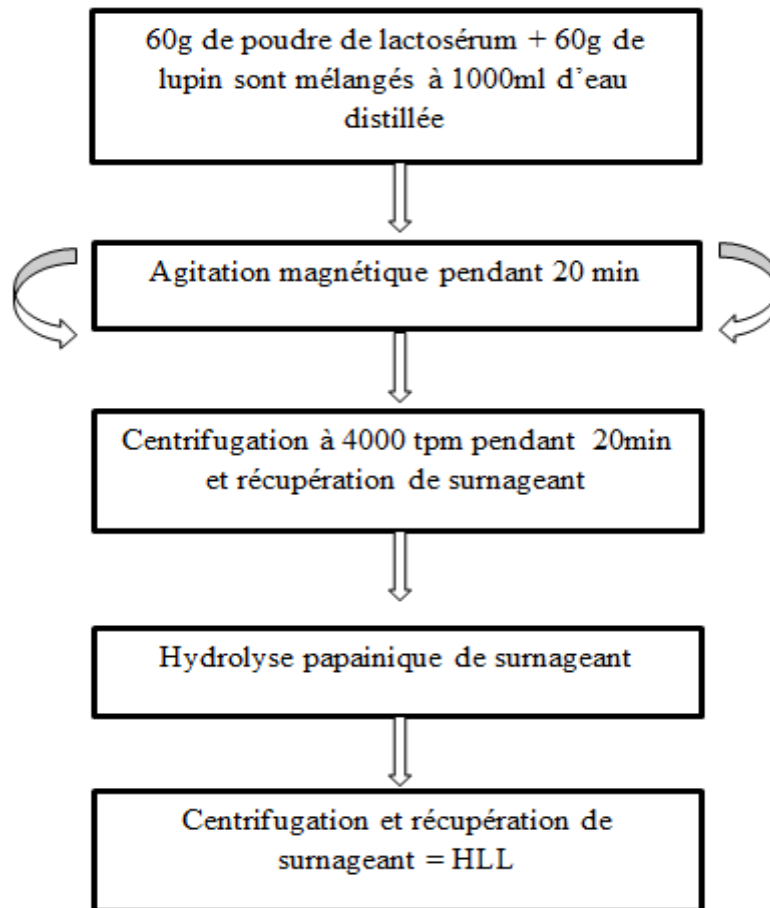


Figure II-1 : les différentes étapes de la préparation de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin (Hanoune et *al.*, 2015).

### 2.3. Méthodes analytiques

Tous les dosages sont effectués en triples essais

#### 2.3.1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin est déterminée par séchage d'un échantillon de 5,00 g introduit dans une capsule en porcelaine séchée et placée dans une étuve à  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  (JOUAN) jusqu'à poids constant (Le coq, 1965).

Le taux de matière sèche (MS) exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante :

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

## Matériel et méthodes

---

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

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

$MS\% = 100 - H\%$

d'où H : humidité

### 2.3.2. Détermination des cendres

La teneur en cendres correspond conventionnellement à la masse du résidu d'incinération de la substance dans les conditions déterminées ci-après. Les capsules contenant la prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche sont portées au four à moufle électrique (Heraeus) et chauffées très progressivement jusqu'à 550°C. Les échantillons sont maintenus à cette température pendant 5 h (Le coq, 1965).

Le taux de cendres, en fraction massique par rapport à la matière sèche exprimé en pourcentage, est donné par la formule suivante:

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

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

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

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

### 2.3.3. Détermination des sucres totaux (Dubois et al., 1956)

Principe :

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

Protocole :

A 1 ml de l'échantillon dilué, est ajouté 1 ml de phénol à 5% et 5 ml de l'acide sulfurique 95% de pureté. Après une agitation lente, les tubes sont incubés à température 100°C pendant 10 min puis refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance

## Matériel et méthodes

---

est faite à 490 nm. La concentration en sucres totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le glucose à 100 µg/ml comme solution standard d'étalonnage (annexe 2).

La teneur en sucres totaux est exprimée en fonction du glucose :

$$ST = [(X \cdot V \cdot D)/P] \cdot 100$$

ST : Taux de sucres totaux (%) ;

X : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) (annexe 2)

D : Facteur de dilution ;

V : Volume de la solution analysée (ml) ;

P : Poids de la prise d'essai (g).

### 2.3.4. Détermination des protéines (Lowry et al., 1951)

Principe :

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions ; la première est la réaction de Biuret, où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la protéine ; la deuxième est la réaction au réactif de *Folin-Ciocalteu* qui réagit sur la tyrosine et la tryptophane présentes dans les protéines et se réduit en un complexe bleu. Cela engendre une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène et c'est la fixation de cuivre par chélation qui faciliterait le transfert d'électrons vers ce réactif.

Après dosage, le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à 500 µg/ml. (Annexe3). Ce dosage est réalisé sur de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin ainsi que les grains de lupin. Chaque dosage est effectué en triple.

Réactifs :

Solution A : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans le NaOH (0,1N) ;

Solution B : CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O à 1% dans l'eau distillée ;

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

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

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>ème</sup>.

## Matériel et méthodes

---

Protocole :

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

### **2.3.5. Dosage du lactose par la méthode de Bertrand selon (Kanaspayeva, 2007)**

Le lactosérum est déféqué par l'hexacyanoferrate (II) de zinc ; une solution cupro-alcaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu. Le précipité d'oxyde cuivreux formé est oxydé par une solution de sulfate ferrique et le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie en présence d'orthophénantroline ferreuse comme Indicateur. [Réf Norme française homologuée. NF V 04-213 Janvier 1971. Lait. Détermination de la teneur en lactose].

Préparation des réactifs

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente.

1. Solution aqueuse d'hexacyanoferrate (II) de potassium.
2. Solution aqueuse d'acétate de zinc.
3. Solution cuivrique.
4. Solution tartro-alcaline.
5. Solution ferrique.
6. Solution titrée de permanganate de potassium 0,1 N. 1 mL de cette solution correspond à 6,35 mg de cuivre.
7. Solution d'orthophénantroline ferreuse.

La préparation des solutions 1, 2, 3, 4, 5 et 6 est décrite dans l'annexe 4.

Mode opératoire :

Prélever à la pipette, sur l'échantillon préparé, 20 mL de lactosérum (reconstitué à 6%), ou peser à 1 mg près, environ 20 g de poudre de lactosérum.

Dans la fiole jaugée de 200 mL, introduire successivement la prise d'essai,

- 2 ml de solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium (1). Agiter.
- 2 ml de solution d'acétate de zinc (2). Agiter.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée tout en mélangeant. Ajouter alors à la pipette 2 ml d'eau distillée (pour tenir compte du volume du précipité).

Agiter, laisser reposer 10 à 15 minutes et filtrer. Filtrer à nouveau si le filtrat n'est pas absolument limpide.

## Matériel et méthodes

---

Dans la fiole conique, introduire :

- 10 ml du filtrat obtenu après défécation, exactement mesuré.
- 10 ml d'eau distillée.

Ensuite

- 20 ml de solution cuivrique (3),
- 20 ml de solution tartro-alcaline (4).

Porter le mélange à ébullition modérée et maintenir celle-ci pendant exactement 3 minutes. Refroidir ensuite immédiatement le contenu de la fiole sous un courant d'eau froide et laisser. Déposer le précipité d'oxyde cuivreux formé. Le liquide surnageant doit demeurer de couleur bleue. Dans le cas contraire, recommencer la détermination sur une dilution appropriée.

Verser le liquide surnageant sur un filtre en amiante ou en verre fritté en activant la filtration par aspiration. Il faut éviter d'entraîner le précipité avec le filtrat et de le laisser au contact de l'air.

Laver trois fois le précipité d'oxyde cuivreux avec 20 mL d'eau distillée bouillie froide, laisser décanter et filtrer à chaque fois le liquide sur le filtre. Rejeter ce filtrat.

Dissoudre ensuite le précipité par une quantité suffisante de solution ferrique (5) (20 à 30 mL). Filtrer la solution obtenue sur le même filtre en ayant soin de dissoudre complètement tout le précipité et de recueillir le filtrat dans la fiole conique à filtrer propre. Rincer la fiole et le filtre avec trois fois 20 mL d'eau distillée bouillie froide.

Ajouter à ce dernier filtrat une goutte d'orthophénantroline ferreuse (7) et titrer par la solution de permanganate de potassium (6).

Le virage est obtenu lorsque la couleur passe du brun orangé au vert foncé.

Soit V le nombre de millilitres de solution (6) nécessaires.

**REMARQUE :**

L'addition de l'indicateur à l'orthophénantroline peut être supprimée. Le virage se produit alors du vert pâle au rose.

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé.

## Matériel et méthodes

---

Calcul et formule :

La teneur en lactose, exprimée en grammes de lactose hydraté par litre de lactosérum est égale à :

$$m = \frac{M \times 1000 \times 200}{1000 \times 20 \times 10} \text{ [g/l]}$$

La teneur en lactose, exprimée en grammes de lactose hydraté pour 100 grammes, est égale à :

$$\frac{M \times 1000 \times 200}{1000 \times 20 \times 10} = \frac{2m}{E} \text{ [%]}$$

Où :

E est la masse, en grammes, de la prise d'essai,

M est la masse, en milligrammes de lactose hydraté lue sur le tableau A (annexe 5) en fonction du volume V de solution de permanganate de potassium nécessaire.

### 2.4. Etudes statistiques

#### 2.4.1. Sélection des nutriments et des paramètres physiques ayant un effet positif sur la croissance des lactobacilles en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman et l'analyse statistique des données.

Un plan d'expériences de Plackett-Burman est utilisé pour sélectionner les variables (facteurs : composants du milieu et paramètres physico-chimiques) qui ont un effet positif sur la croissance des souches de lactobacilles testées (Plackett et Burman, 1946). Un ensemble de 12 expériences ( $k + 1$ ) pour 11 facteurs ( $k = 11$ ) est réalisé, chaque variable est représentée à deux niveaux: niveaux supérieur (+1) et niveaux inférieur (-1).

Concernant les facteurs

L'extrait de levure (X1), l'extrait de viande (X2), l'acétate de sodium (X3), le citrate de tri-ammonium (X4),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (X5),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (X6),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (X7), tween80 (X8), la vitesse d'agitation (X9), le taux d'inoculum (X10) et le pH (X11) sont utilisés pour *Lactobacillus fermentum* (tableau II-1).

## Matériel et méthodes

---

L'extrait de levure (X1), l'extrait de viande (X2), le citrate de tri-ammonium (X3), MgSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (X4), erreur 1 (X5), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (X6), tween80 (X7), pH (X8), le taux d'inoculum (X9), la vitesse d'agitation (X10) et erreur 2 (X11) sont employés pour *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* (tableau II-2).

Cependant, l'arabinose (X1), le xylose (X2), le cellobiose (X3), le mannose (X4), erreur 1 (X5), le ribose (X6), le rhamnose (X7), le mélibiose (X8), le lactulose (X9), le saccharose (X10) et erreur 2 (X11) sont testés pour *Lactobacillus farciminis* (tableau II-3).

Tous les éléments nutritifs sont ajoutés au milieu à base de lupin et de lactosérum, Après agitation, les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20mn.

Pour la souche *Lactobacillus farciminis* le pH des milieux est ajusté à 6,2.

MINITAB 16 Version d'essai est utilisé pour l'analyse de la régression des données expérimentales obtenues.

La signification de chaque variable est déterminée via le test de Student et le niveau de signification est donné comme suit  $p \leq 0.3$  ou  $p \leq 0.05$ .

Tableau II-1 : Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes utilisées pour *Lactobacillus fermentum*.

Facteurs	Code du Niveau supérieur(+1) facteur		Niveau inférieur (1)
Extrait de levure (g/L)	$X_1$	5.0	0.0
Extrait de viande (g/L)	$X_2$	4.0	0.0
Acétate de sodium (g/L)	$X_3$	5.0	0.0
Citrate tri-ammonium (g/L)	$X_4$	2.0	0.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	$X_5$	0.2	0.0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (g/L)	$X_6$	0.05	0.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (g/L)	$X_7$	1.0	0.1
Tween 80 (ml/L)	$X_8$	1.0	0.0
Vitesse d'agitation (tpm)	$X_9$	120	0.0
Taux d'inoculum (%)	$X_{10}$	5.0	2.0
pH	$X_{11}$	6.5	5.5

## Matériel et méthodes

Tableau II-2 : Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes employées pour *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Facteurs	Code du facteur	Niveau supérieur (+1)	Niveau inférieur (1)
Extrait de levure (g/L)	$X_1$	5.0	0.0
Extrait de viande (g/L)	$X_2$	4.0	0.0
Citrate tri-ammonium (g/L)	$X_3$	2.0	0.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	$X_4$	0.2	0.0
Erreur 1	$X_5$	/	/
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (g/L)	$X_6$	1.0	0.1
Tween 80 (ml/L)	$X_7$	1.0	0.0
pH	$X_8$	6.5	5.5
Taux d'inoculum (%)	$X_9$	5.0	2.0
Vitesse d'agitation (tpm)	$X_{10}$	120	0.0
Erreur 2	$X_{11}$	/	/

Tableau II-3 : Les différents facteurs étudiés et leurs concentrations correspondantes utilisées pour *Lactobacillus farciminis*.

Facteurs(%)	Code du facteur	Niveau supérieur (+1)	Niveau inférieur (1)
Arabinose	$X_1$	2.0	0.0
Xylose	$X_2$	2.0	0.0
Cellobiose	$X_3$	2.0	0.0
Mannose	$X_4$	2.0	0.0
Erreur 1	$X_5$	/	/
Ribose	$X_6$	2.0	0.0
Rhamnose	$X_7$	2.0	0.0
Mélibiose	$X_8$	2.0	0.0
Lactulose	$X_9$	2.0	0.0
Saccharose	$X_{10}$	2.0	0.0
Erreur 2	$X_{11}$	/	/

### 2.4.2. Plan composite centré (PCC)

Le plan composite centré (PCC) est utilisé comme une seconde expérience pour déterminer le niveau optimal de chaque variable significative avec un effet positif sur la croissance des lactobacilles, ainsi les interactions qui peuvent exister entre ces variables.

Sur la base des résultats du plan d'expériences de Plackett et Burman, les facteurs ayant un effet significatif positif sur la croissance des 04 lactobacilles sont sélectionnés pour une optimisation en utilisant le PCC. A cet effet, un plan factoriel complet  $2^2$  est réalisé avec cinq répétitions au niveau des points centraux menant à une matrice d'expériences du PCC composée de 13 essais expérimentaux pour *Lactobacillus fermentum* et un plan factoriel complet  $2^3$  composé de 20 essais expérimentaux est utilisé pour *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus platarum* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Chaque facteur a été étudié à cinq niveaux expérimentaux (-1, 41, -1, 0, +1 et 1, 41) MINITAB 16 Version d'essai est utilisé pour l'analyse de la régression multiple cependant, Statistica est utilisé pour la génération du plan de surface et le contour 3D des facteurs sélectionnés.

### 2.5. Mesure de la croissance bactérienne

#### 2.5.1. Mesure spectrophotométrique

Dans un milieu de culture limpide, la biomasse est quantifiable à l'aide d'une mesure de turbidité par un néphélomètre, c'est-à-dire par mesure de diffusion de la lumière à un angle de 90°. Cependant les spectrophotomètres à transmission sont généralement utilisés (Monnet et al, 2008).

La mesure de la croissance bactérienne est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 600 nm après dilutions appropriées pour maintenir les valeurs d'absorbance des échantillons fermentés préalablement incubés à 37 ° C pendant 24 h en dessous de 0,6 et la valeur d'absorbance obtenue est multipliée par le facteur de dilution correspondant pour atteindre la valeur finale de DO<sub>600</sub>.

## Matériel et méthodes

---

### 2.5.2. Technique d'inoculation dans la masse

A partir des cultures de 18 -24 h sur les milieux formulés et après des dilutions décimales à l'eau physiologique stérile, seules les dilutions  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  des lactobacilles sont ensemencées.

1ml des deux dilutions ( $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) est placé dans la boîte de Pétri. Ensuite 10 à 15 ml du milieu MRS gélosé en surfusion ( $47\pm 2$  °C) sont coulés dans la boîte et mélangés uniformément avec l'inoculum par un lent mouvement circulaire horizontal. Ce type de numération convient parfaitement aux germes aéro-anaérobies (c'est le cas des lactobacilles).

Les cultures sont incubées pendant 48 h à une température de 37 °C. La croissance des lactobacilles est estimée par le nombre d'UFC (unité formant colonie).

Les résultats sont exprimés en log UFC/ml.

### 2.6. Cinétique de croissance des Lactobacilles

Les courbes de croissance sont établies afin de comparer la croissance des lactobacilles sur le milieu MRS et les milieux élaborés à base de lactosérum et de lupin. Afin d'atteindre cet objectif, la densité optique  $DO_{600}$  est mesurée chaque 2 h jusqu'à l'arrêt de la croissance (phase stationnaire). Pour effectuer cette comparaison les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques.



### **III Résultats et Discussion**

## Résultats et discussion

### 1. Mise au point du milieu de culture pour la croissance des lactobacilles

Les résultats de l'évaluation de la croissance des souches testées par la mesure de l'absorbance à DO<sub>600</sub> indiquent que les 6 milieux présentent des potentiels de croissance intéressants avec des valeurs de l'absorbance à DO<sub>600</sub> qui varient de 0,9 à 5,5 pour *Lactobacillus brevis* et de 1,1 à 6 pour *Lactobacillus plantarum* (figure III-1 et III-2). Toutefois il est à signaler que les deux souches se développent de manière quasi similaire sur les 6 milieux préparés.

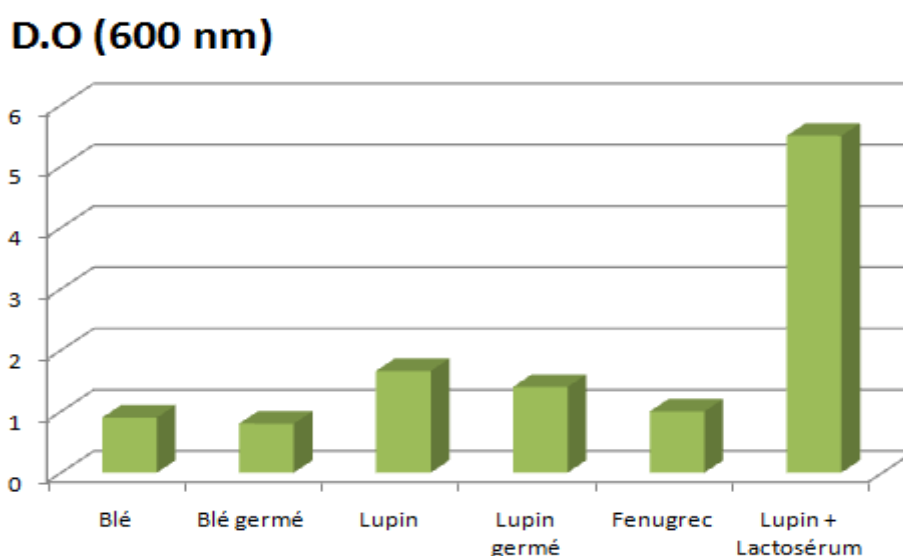


Figure III-1 : évaluation de la croissance de *Lactobacillus brevis* sur les milieux formulés

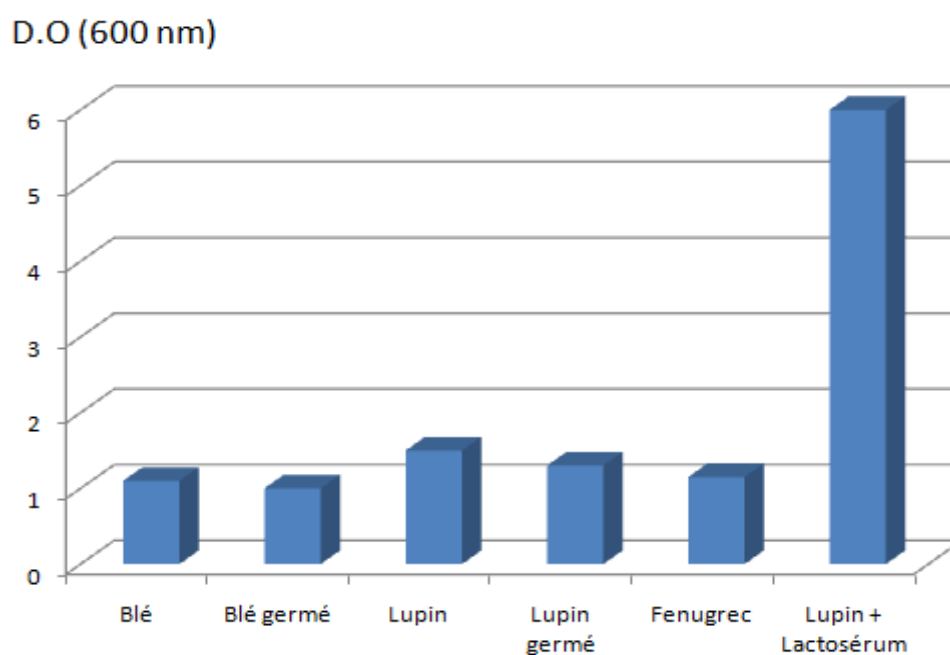


Figure III-2 : évaluation de la croissance de *Lactobacillus plantarum* sur les milieux formulés

## Résultats et discussion

La comparaison entre les différents milieux nous permet de constater que :

- Les milieux à base du blé, blé germé, lupin germé et fenugrec ont un potentiel intéressant et presque équivalent pour la multiplication des deux lactobacilles. Cependant la croissance est meilleure sur le milieu lupin pour les deux souches testées, ainsi il a été sélectionné pour des études plus approfondies.
- La supplémentation du lactosérum au lupin améliore de façon très significative la croissance des deux lactobacilles, par conséquent, cette combinaison a fait l'objet d'une optimisation ultérieure.

### 2. Composition de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin

L'utilisation de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin comme milieu de base pour la fermentation lactique nécessite une étude biochimique de sa composition afin de procéder à la fin à des essais de supplémentations pour obtenir un milieu optimal pour la croissance des lactobacilles testés.

L'étude de la composition de l'hydrolysate, de lactosérum, et de lupin utilisés pour la préparation des milieux de culture a donné les résultats résumés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: composition moyenne de l'hydrolysate, de lactosérum, et de lupin.

	Proteines (%)	Sucres totaux (%)	Lactose (%)	Cendres (%)
Poudre de lactosérum	21,10%	/	56,66%	/
Lupin	33,56%	/	/	/
L'hydrolysate de lactosérum et de lupin	53,42%	31,65%	/	4%

Ces résultats font apparaître une forte teneur en protéines (56,66%), ceci peut être expliqué par la richesse de lupin en protéines (33,56%).

L'hydrolysate de lactosérum et de lupin utilisé au cours de cette étude contient un taux de sucres totaux de 31,65% et un taux de cendre de 4%.

## Résultats et discussion

### 3. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus fermentum*

#### 3.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de *Lactobacillus fermentum* en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB).

##### 3.1.1. Estimation du potentiel de la croissance de *Lactobacillus fermentum*

L'examen des résultats de la densité optique (tableau III-2) montre une grande variation dans la croissance de *Lactobacillus fermentum* dans les 12 essais (l'absorbance a  $DO_{600}$  varie de 1,06 à 7,60), ce qui implique la nécessité d'utiliser le plan d'expériences de PB pour sélectionner les facteurs (nutriments et des paramètres physico-chimiques) ayant un effet significatif positif sur la croissance de la souche en vue de produire sa biomasse.

Tableau III-2- Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les valeurs de la densité optique (la réponse).

N° d'essai	Facteurs											$DO_{600}$
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	7,36
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	6,98
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	7,26
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1,44
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1,78
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	1,06
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	7,50
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	1,12
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	1,86
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	7,60
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	1,12
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6,08

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

## Résultats et discussion

### 3.1.2. Traitement et analyse statistique des facteurs étudiés

Le traitement des données est effectué par l'étude de la régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16.

Les résultats de l'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan du Plackett et Burman sont mentionnés dans le tableau III-3.

Tableau III-3 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lactobacillus fermentum*.

Facteur	Coef.	SE Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante	4,2633	0,1244	34,28	0,000
Extrait de levure	0,1067	0,1244	0,86	0,454
Extrait de viande	0,1300	0,1244	1,05	0,373
Acétate de sodium	0,4302	0,8883	0,48	0,641
Citrate tri-ammonium	0,0433	0,1244	0,35	0,751
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0,1602	0,8883	-0,18	0,861
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-0,0033	0,1244	-0,03	0,980
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	-1,5612	0,9140	-1,71	0,126
Tween 80	0,1867	0,1244	1,50	0,230
Vitesse d'agitation	-2,8667	0,1244	-23,05	0,000
Taux d'inoculum	0,2633	0,1244	2,12	0,125
pH	-0,0333	0,1244	-0,27	0,806

$R^2 = 99.40\%$  ,  $R^2(aj) = 98.00\%$

Les données statistiques obtenues montrent l'influence de 4 facteurs: l'agitation, le taux d'inoculum, le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O et le tween 80 avec des valeurs de *p* qui correspondent à 0,00, 0,125, 0,126 et 0,23, respectivement.

L'agitation est déterminée comme étant le facteur le plus important, cependant, avec un effet négatif. Au cours des six essais avec agitation, la croissance bactérienne est faible (les valeurs de l'absorbance à DO<sub>600nm</sub> entre 1,06 et 1,86, par ailleurs elle atteint des valeurs qui varient de 6,08 à 7,60 unité de DO dans les six autres essais sans agitation. Par conséquent, l'agitation montre un effet fortement inhibiteur sur la croissance *lactobacillus fermentum*. Ce résultat est cohérent avec les recherches antérieures montrant que l'agitation peut être

## Résultats et discussion

---

défavorable pour la croissance des BL, ceci est particulièrement le cas de *Streptococcus thermophilus* (Louaileche et al., 1993).

Le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  montre également un effet négatif, ceci peut être expliqué par la présence de sodium dans la lactosérum avec une concentration qui peut dépasser l'exigence de la souche (Wong et al., 1978).

Le taux d'inoculum semble avoir un effet positif sur la croissance de la souche. Ainsi, il a été choisi pour une optimisation ultérieure en utilisant le PCC pour déterminer le niveau optimal de la biomasse active initiale pour obtenir une meilleure croissance de la souche.

Le tween 80 possède également un effet positif, ce dernier se compose d'un mélange d'esters oléiques, ce qui constitue une source d'acides gras essentiels pour la croissance de ces bactéries, et il a été également choisi pour une optimisation plus poussée.

Tous les autres sept facteurs (extrait de levure, extrait de viande, acétate de sodium, citrate tri-ammonium,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et le pH n'ont aucun effet significatif sur la croissance bactérienne, par conséquent, ils ont été éliminés des autres expériences du PCC.

### 3.2. Détermination des optima par le plan composite centré (PCC)

On se basant sur les résultats du plan de Plackett et Burman, le taux d'inoculum (X1) et le tween 80 (X2) ont été sélectionnés afin de déterminer le niveau optimal de chacun de ces facteurs pour une amélioration de la croissance bactérienne. Le taux d'inoculum est utilisé dans une gamme de 2, 37-6, 62% et le tween 80 de 0, 79 à 2, 2 ml / l.

La matrice d'expériences des variables testées et les résultats expérimentaux de la densité optique sont présentés dans le tableau III-4.

Les coefficients de régression et les valeurs des probabilités (*P*) correspondantes sont représentés dans le Tableau III-5.

## Résultats et discussion

Tableau III-4 : Résultats de la densité optique de *Lactobacillus fermentum* selon le plan composite centré de Box et Wilson.

N° d'essai	X1	X2	DO (600 nm)
1	+1	-1	5,92
2	+1	+1	5,92
3	0	0	6,24
4	0	0	6,16
5	0	+ $\alpha$	5,60
6	-1	+1	4,72
7	- $\alpha$	0	4,40
8	0	- $\alpha$	5,04
9	0	0	6,20
10	-1	-1	5,04
11	+ $\alpha$	0	5,84
12	0	0	6,32
13	0	0	6,30

Tableau III-5 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lactobacillus fermentum*

Terme	Coef	SE Coef	<i>t</i>	<i>p</i>
Constant	-3,1626	1,24148	-2,547	0,038
X <sub>1</sub>	2,2510	0,33742	6,671	0,000
X <sub>2</sub>	4,6420	1,01226	4,586	0,003
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-0,2298	0,03104	-7,403	0,000
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	-1,6680	0,27935	-5,971	0,001
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,12280	0,12280	0,869	0,414

## Résultats et discussion

---

A partir des valeurs des probabilités des différents termes ( $P$ ), les deux facteurs (taux d'inoculum et tween 80) semblent être significatifs avec un coefficient positif (des valeurs de  $p$  qui correspondent à 0,000 et 0,003 respectivement). Cependant, leurs interactions sont non significatives.

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est calculé comme 0,9537 ce qui indique une bonne concordance entre l'observation expérimentale et les valeurs prédites (Xu et *al.*, 2008). Cependant, le modèle peut expliquer 95,37% de la variabilité de la réponse. Seulement 4,63% de la variation totale ne peut pas être expliquée par le modèle.

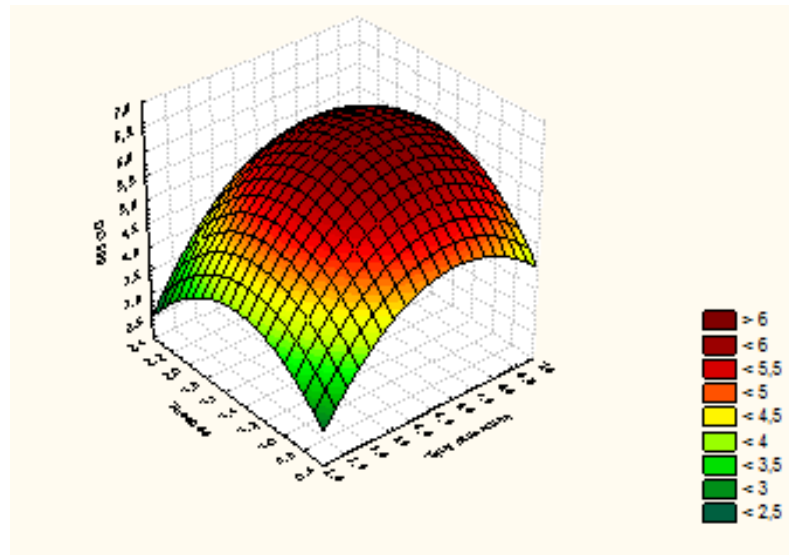
La valeur du coefficient de détermination ajusté ( $R^2_{aj} = 0,9207$ ) est assez élevée pour indiquer l'importance du modèle (Papagora et *al.*, 2013).

La figure III-3 a, b représente le graphe tridimensionnel et le contour plot de la croissance de *Lactobacillus fermentum* montrant l'interaction entre le tween 80 et le taux d'inoculum, elle fournit une interprétation visuelle de l'interaction entre les deux facteurs choisis et elle permet ainsi de déterminer les niveaux optimaux de chaque variable pour une croissance maximale de *Lactobacillus fermentum*. Il ressort de la forme convexe du tracé tridimensionnel que les niveaux des concentrations sont bien choisis.

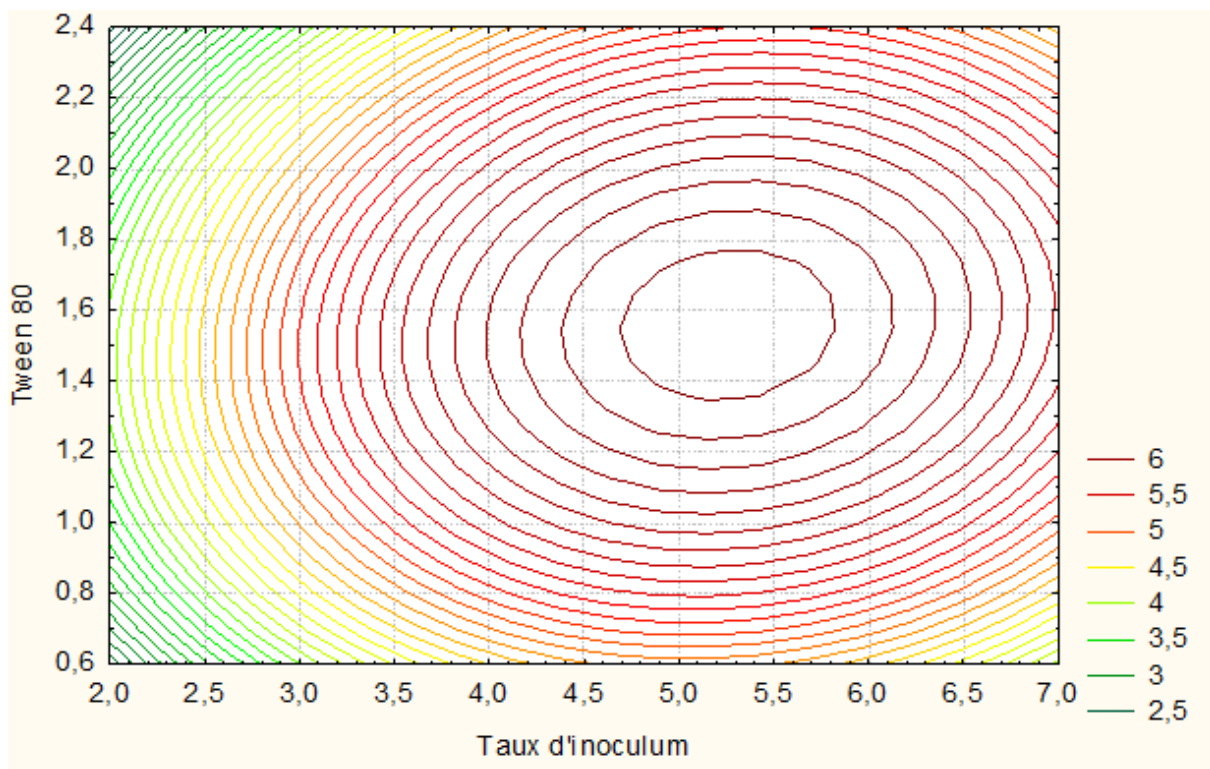
L'examen du graphe tridimensionnel et du contour plot montre une augmentation de la croissance lorsque le taux d'inoculum augmente jusqu'à 5,25% et le tween 80 atteint une concentration de 1,56ml/l.

Un maximum de croissance de *Lactobacillus fermentum* ( $DO_{600} = 6,32$ ) est obtenu en combinant les niveaux optimaux du taux d'inoculum et de tween 80 donnés à 5,25% et 1,56ml/l respectivement. Une diminution de la croissance est observée lorsque les niveaux dépassent ces valeurs optimales données.

## Résultats et discussion



(a)



(b)

Figure III-3 a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus fermentum* montrant l'interaction entre le tween 80 et le taux d'inoculum.

## Résultats et discussion

### 3.3. Validation du modèle

La validation du modèle est réalisée sur un milieu à base d'hydrolysate de lactosérum et de lupin additionné de 1,56 ml / l de tween (milieu HLLT), inoculé à un taux de 5,25% et incubé à 37 ° C pendant 24 h. Dans ces conditions optimales, la réponse prédite de la croissance bactérienne est de 6,37 (figure III-4) et la moyenne de la croissance observée est de 6,88.

La bonne concordance entre la valeur prédite et la valeur expérimentale confirme la validité du modèle et son haut degré de similitude indique que la méthodologie de surface de réponse est un outil d'optimisation puissant.

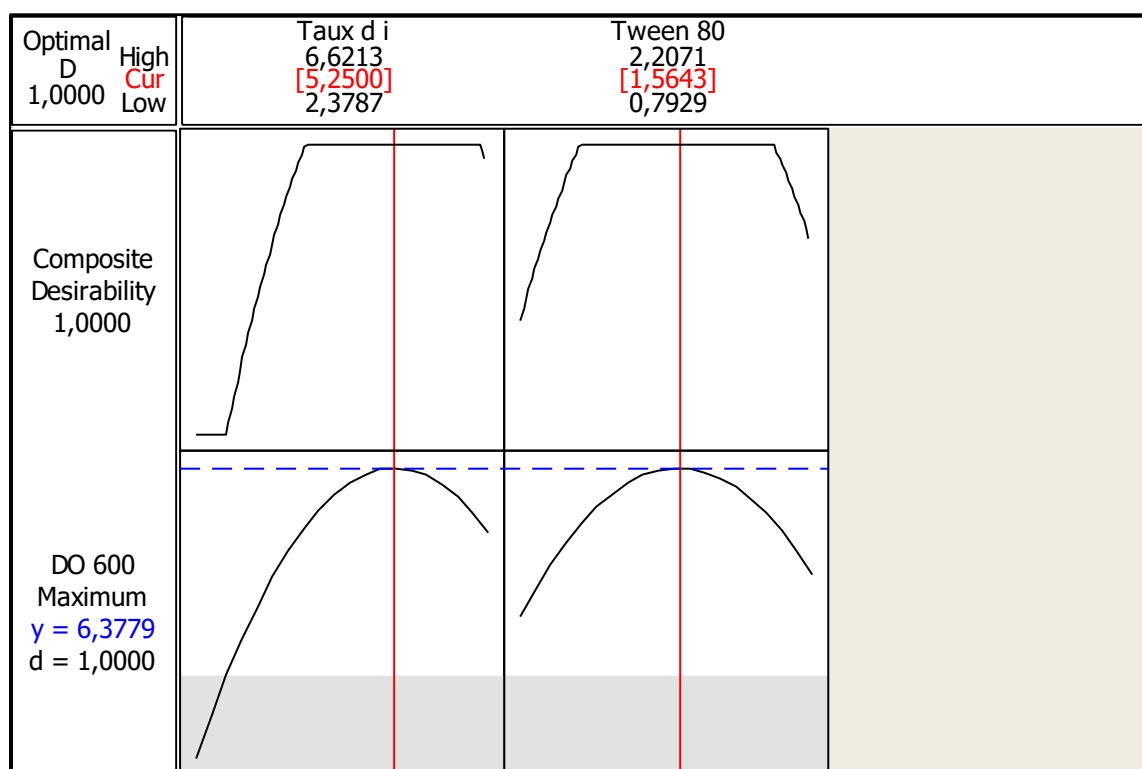


Figure III-4 : diagramme d'optimisation montrant l'effet de tween 80 et du taux d'inoculum sur la croissance de *Lactobacillus fermentum*.

## Résultats et discussion

### 3.4. Cinétiques de croissance de *Lactobacillus fermentum*

Afin de comparer la croissance bactérienne sur le milieu élaboré (HLLT 1) avec celle sur MRS, deux courbes sont tracées avec un axe vertical représentant les valeurs de  $DO_{600}$  et un axe horizontal représentant le temps écoulé en heures (figure III-5).

Il a été constaté que la croissance bactérienne suit un schéma classique d'une culture discontinue. La croissance de la souche sur le milieu HLLT 1 est généralement beaucoup plus élevée que celle observée sur le milieu MRS. La phase exponentielle est obtenue au bout de 5 h sur le milieu HLLT 1 et après 8 h sur le milieu MRS et les valeurs maximales de l'absorbance à  $DO_{600}$  sont 7,04 sur milieu HLLT 1 et 4,08 sur milieu MRS.

La croissance de *Lactobacillus fermentum* sur le milieu HLLT 1 est supérieure à 72,54% que celle enregistrée sur le milieu MRS.

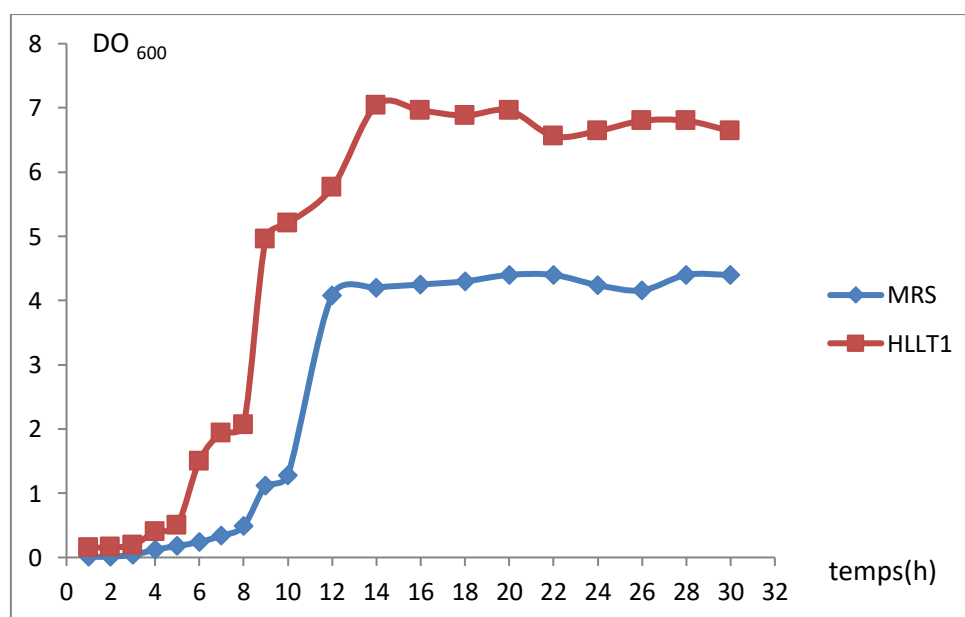


Figure III-5: Cinétiques de croissance de *Lactobacillus fermentum* sur milieux MRS et HLLT 1.

## Résultats et discussion

### 4. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus brevis*

#### 4.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de *Lactobacillus brevis* en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)

##### 4.1.1. Estimation du potentiel de croissance de *Lactobacillus brevis*

Les résultats du dénombrement des cellules viables de *Lactobacillus brevis* sont montrés dans le tableau III-6. D'après ces résultats, la croissance est meilleure sur les milieux N° 5 et N° 11, cependant et elle est faible sur le milieu N° 12.

Tableau III-6 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les valeurs du dénombrement exprimées en log UFC/ml (la réponse).

N° d'essai	Facteurs											Log UFC/ml
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	9,00
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	8,80
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	8,73
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	9,05
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	9,14
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,78
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	9,07
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,91
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	9,07
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	8,95
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	9,13
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,41

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

## Résultats et discussion

### 4.1.2. Traitement et analyse statistique des facteurs étudiés pour la croissance de *Lactobacillus brevis*

Le traitement des données est effectué par l'étude de la régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16 et le diagramme de Pareto.

On se basant sur les résultats de l'analyse multiple de la régression (tableau III-7) et le résultat de diagramme de Pareto (figure III-6), 4 facteurs (le tween 80, la vitesse d'agitation, le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le MgSO<sub>4</sub>) semblent être significatifs et ils affectent considérablement la croissance de la souche.

Tableau III-7 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lactobacillus brevis*

Terme	Effet	Coef.	SE Coef.	<i>t</i>	<i>p</i>
Constante		8,82000	0,013017	677,57	0,000
Extrait de levure	0,06667	0,03333	0,009204	3,62	0,069
Extrait de viande	0,04333	0,02167	0,009204	2,35	0,143
Citrate tri-ammonium	0,00667	0,00333	0,009204	0,36	0,752
MgSO <sub>4</sub>	0,17333	0,08667	0,009204	9,42	0,011
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,17667	0,08833	0,009204	9,60	0,011
Tween 80	0,22667	0,11333	0,009204	12,31	0,007
pH	0,05667	0,02833	0,009204	3,08	0,091
Taux d'inoculum	0,03333	0,01667	0,009204	1,81	0,212
Vitesse d'agitation	0,00333	0,00167	0,000153	10,86	0,008

$R^2 = 99,59\%$   $R^2(\text{pred}) = 85,12\%$   $R^2(\text{aj}) = 97,73\%$

## Résultats et discussion

Ces facteurs ont un effet positif sur la croissance de la souche avec des valeurs de  $p$  qui correspondent à 0,007, 0,008, 0,011 et 0,011 respectivement, et par conséquent, ils sont pris en considération dans le prochain processus d'optimisation. Cependant, le  $MgSO_4$  n'est pas retenu.

Tous les autres cinq facteurs n'ont aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) et par conséquent ils sont éliminés du plan d'optimisation PCC.

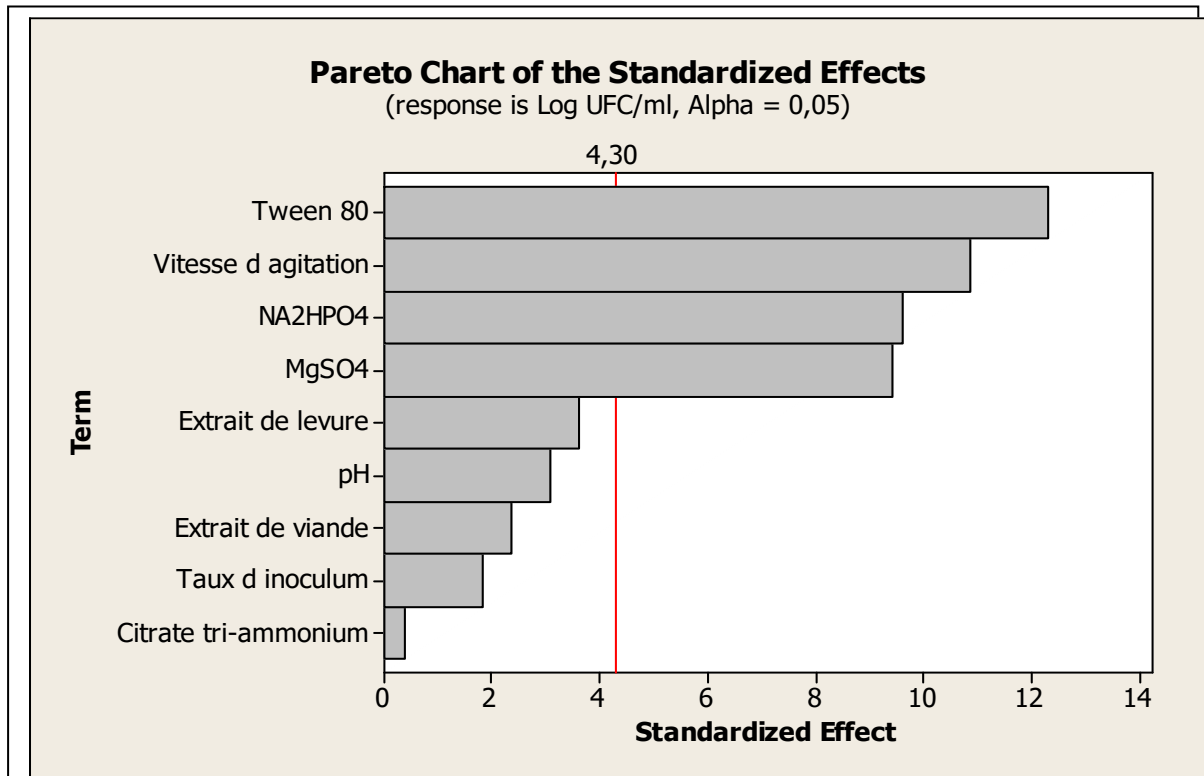


Figure III-6 : diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.

## Résultats et discussion

### 4.2. Détermination des optima par le plan composite centré

Dans cette étape d'optimisation, trois facteurs le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $X_1$ ), le tween 80 ( $X_2$ ) et la vitesse d'agitation ( $X_3$ ) sont sélectionnés afin de déterminer le niveau optimal de chacun de ces facteurs pour une amélioration de la croissance bactérienne. Le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  est utilisé dans une gamme de 0,65-2,34 (g/l) le tween 80 de 0,65-2,34 (ml / l) et la vitesse d'agitation de 12,72-147,27 tpm. La matrice d'expériences des variables testées et les résultats expérimentaux du dénombrement sont présentés dans le tableau III-8.

Tableau III-8 : Résultats du dénombrement de *Lactobacillus brevis* selon le plan composite centré de Box et Wilson.

N° d'essai	X1	X2	X3	Log UFC/ml
1	-1	-1	-1	8,80
2	+1	-1	-1	8,90
3	-1	+1	-1	8,90
4	+1	+1	-1	9,17
5	-1	-1	+1	9,20
6	+1	-1	+1	9,00
7	-1	+1	+1	9,10
8	+1	+1	+1	9,06
9	$-\alpha$	0	0	9,02
10	$+\alpha$	0	0	9,04
11	0	$-\alpha$	0	8,95
12	0	$+\alpha$	0	9,09
13	0	0	$-\alpha$	9,00
14	0	0	$+\alpha$	9,20
15	0	0	0	9,10
16	0	0	0	9,10
17	0	0	0	9,10
18	0	0	0	9,10
19	0	0	0	9,10
20	0	0	0	9,10

## Résultats et discussion

Les coefficients de régression et les valeurs des probabilités ( $P$ ) correspondantes sont représentés dans le Tableau III-9.

Tableau III-9 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lactobacillus brevis*

Terme	Coef	SE Coef	$t$	$p$
Constante	9,10099	0,008213	1108,165	0,000
X <sub>1</sub>	0,01198	0,005449	2,199	0,053
X <sub>2</sub>	0,04140	0,005449	7,599	0,000
X <sub>3</sub>	0,06783	0,005449	12,449	0,000
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-0,03123	0,005304	-5,888	0,000
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	-0,03477	0,005304	-6,554	0,000
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	-0,00648	0,005304	-1,222	0,250
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,04125	0,007119	5,794	0,000
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	-0,07625	0,007119	-10,710	0,000
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	-0,05125	0,007119	-7,199	0,000

$R^2 = 97,99\%$

$R^2(\text{pred}) = 84,82\%$

$R^2(\text{aj}) = 96,19\%$

## Résultats et discussion

---

A partir des valeurs des probabilités des différents termes ( $P$ ), on peut conclure les points suivants :

- parmi les trois coefficients linéaires, le tween 80 et la vitesse d'agitation sont les deux variables qui ont plus d'effet sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.
- Les coefficients quadratiques  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{Na}_2\text{HPO}_4$  et tween 80  $\times$  tween 80 sont significatifs, tandis que Le coefficient quadratique vitesse d'agitation  $\times$  vitesse d'agitation semble être non significatif.
- Les trois coefficients d'interaction  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$  tween 80,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$  vitesse d'agitation et tween 80  $\times$  vitesse d'agitation sont significatifs.

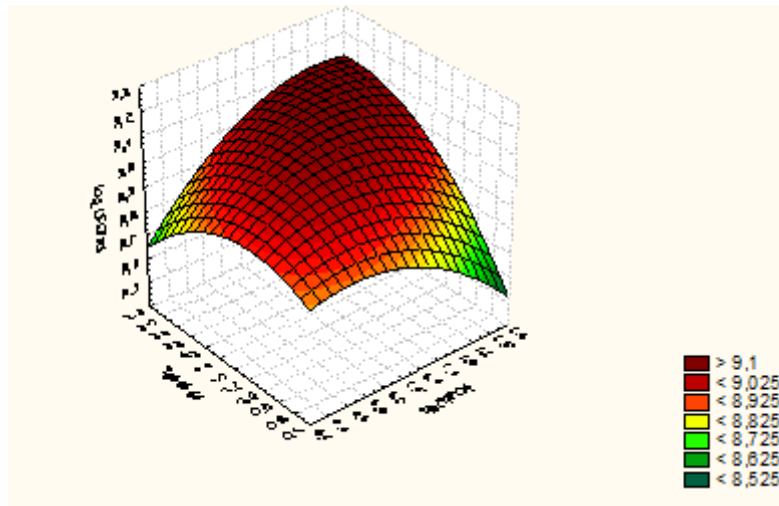
La valeur observée de  $R^2$  montre que le modèle peut expliquer les variations totales de la réponse à 97,99% (une valeur  $> 0,75$  indique la validité du modèle). Cela veut dire que le modèle choisi est représentatif du système et confirme la forte relation qui existe entre la croissance de *Lactobacillus brevis* et les trois facteurs optimisés. Le  $R^2$  ajusté corrige les valeurs de  $R^2$ . La valeur de  $R^2$  ajusté (96,19%) dans cette étude préconise une signification élevée du modèle (pour un bon modèle statistique, la valeur de  $R^2$  devrait être la plus proche possible de 1).

La figure III-7 a, b représente l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de tween ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.

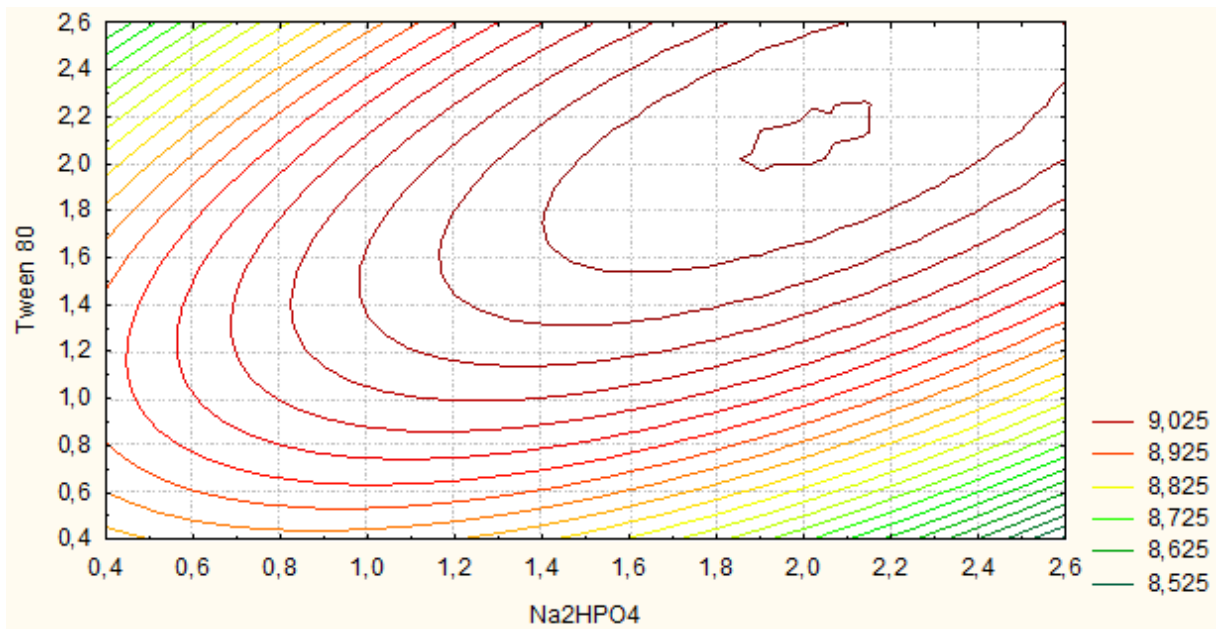
La figure III-8 a, b représente l'effet de tween 80 et de la vitesse d'agitation ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.

La figure III-9 a, b représente l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de la vitesse d'agitation ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.

## Résultats et discussion



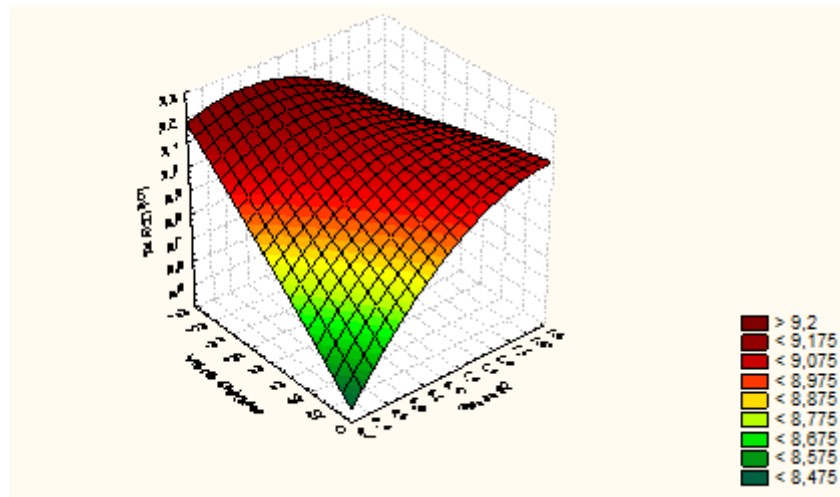
(a)



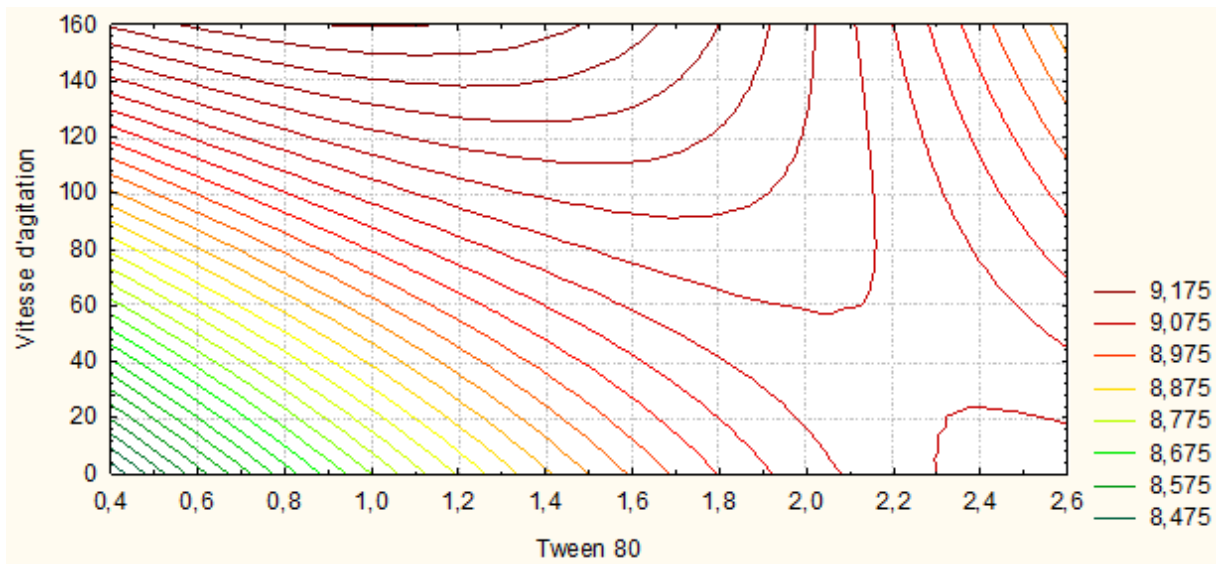
(b)

Figure III.7 a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus brevis* montrant l'interaction entre le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le tween 80.

## Résultats et discussion



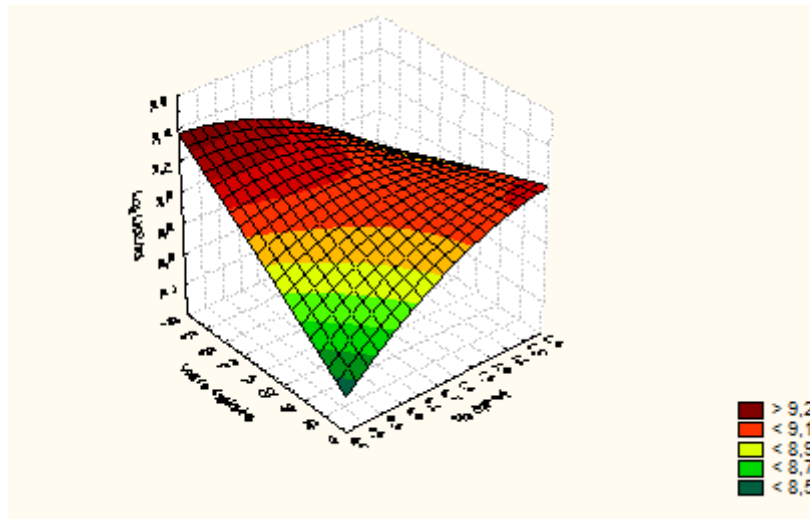
(a)



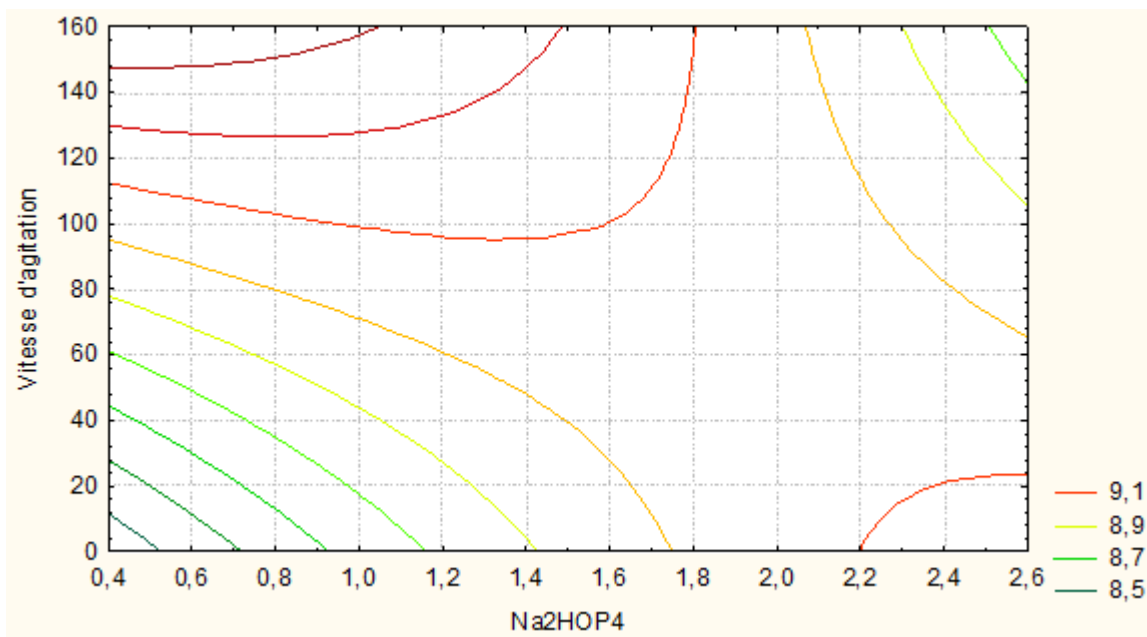
(b)

Figure III.8 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus brevis* montrant l'interaction entre le tween 80 et la vitesse d'agitation.

## Résultats et discussion



(a)



(b)

Figure III.9 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus brevis* montrant l'interaction entre le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et la vitesse d'agitation.

## Résultats et discussion

### 4.3. Validation du modèle

La validation du modèle est réalisée par l'application des conditions théoriques optimales suivantes : l'hydrolysate de lactosérum et de lupin additionné de 0,65g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,67ml/l de tween 80 et une agitation de 147,47 tpm (milieu HLLNT 1). Sous ces conditions, le nombre de cellules viables théorique exprimé en log UFC/ml est de 9,39 (figure III-10). Tandis que la valeur expérimentale est de 9,30. Ces résultats confirment la validité du modèle. En effet, la valeur expérimentale est proche de la valeur théorique.

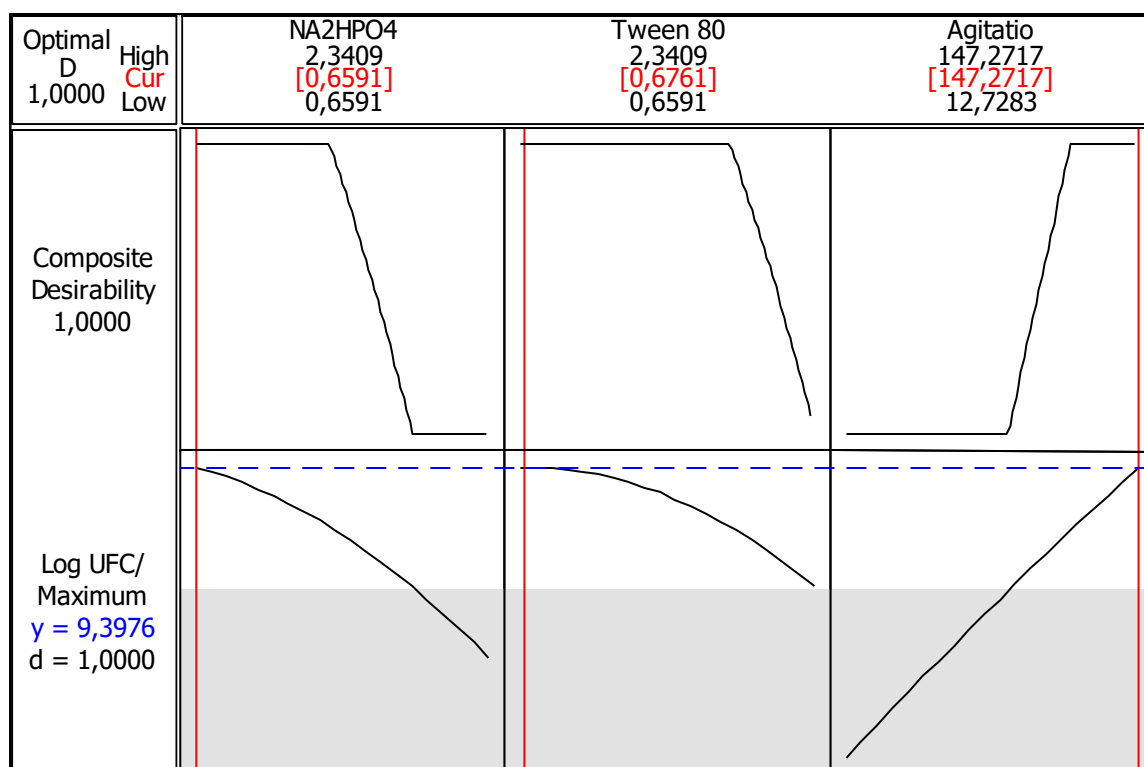


Figure III-10 : diagramme d'optimisation montrant l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , de tween 80 et de la vitesse d'agitation sur la croissance de *Lactobacillus brevis*.

## Résultats et discussion

### 4.4. Cinétiques de croissance de *Lactobacillus brevis*

Les résultats précédents nous ont conduits à examiner la cinétique de croissance de *Lactobacillus brevis* sur le milieu élaboré (HLLNT 1) en comparaison avec le milieu MRS (figure III-11). Les deux milieux sont inoculés à 2% et incubés à 37°C pendant 30 h sous une agitation de 147,47 tpm.

On peut faire les remarques suivantes :

- la cinétique de croissance de la souche sur les deux milieux se déroule selon un schéma classique d'une culture discontinue.
- La croissance de la souche est presque similaire sur les deux milieux, la phase de latence dure 6 h, La durée de la phase de croissance exponentielle est de 8 heures environ sur les deux milieux. Enfin, la phase de ralentissement commence après 14h d'incubation.
- Après 24 h d'incubation, les deux cultures sontensemencées sur MRS gélosé, le nombre de cellule obtenu en Log UFC/ml est 9,30 sur milieu HLLNT1 et 9,16 sur milieu MRS.

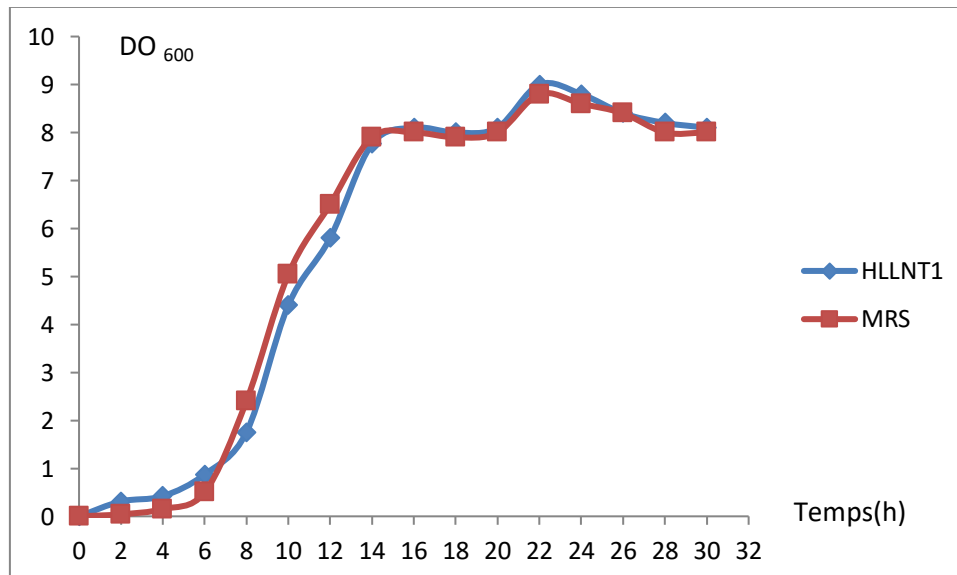


Figure III-11: Cinétiques de croissance de *Lactobacillus brevis* sur milieux MRS et HLLNT1.

## Résultats et discussion

### 5. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus plantarum*

#### 5.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de *Lactobacillus plantarum* en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)

##### 5.1.1. Estimation du potentiel de la croissance de *Lactobacillus plantarum*

Les résultats du dénombrement des cellules viables de *Lactobacillus plantarum* sont donnés dans le tableau III-10. Ces résultats montrent le dénombrement de la croissance varie de 8,30 log UFC/ml, valeur enregistrée sur le milieu 03 à 9,00 log UFC/ml sur le milieu N°11.

Tableau III-10- Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).

N° d'essai	Facteurs											Log
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	UFC/ml
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	8,50
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	8,40
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	8,30
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	8,70
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	8,72
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,60
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	8,64
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,63
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	8,80
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	8,65
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	9,00
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,32

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

## Résultats et discussion

### 5.1.2. Traitement et analyse statistique des facteurs étudiés pour la croissance de *Lactobacillus plantarum*

Le traitement des données est effectué par l'étude de la régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16 et le diagramme de Pareto.

Nous remarquons à travers l'analyse multiple de la régression (tableau III-11) et celle du diagramme de Pareto (figure III-12), 5 facteurs ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , tween 80, pH, taux d'inoculum et la vitesse d'agitation possèdent un effet significatif avec des valeurs de  $p$  qui correspondent à 0,006, 0,014, 0,039, 0,031 et 0,023 respectivement.

Tableau III-11 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

Terme	Effet	Coef.	SE Coef.	$t$	$P$
Constante		8,54000	0,014337	595,65	0,000
Extrait de levure	-0,02000	-0,01000	0,010138	-0,99	0,428
Extrait de viande	0,01000	0,00500	0,010138	0,49	0,671
Citrate tri-ammonium	-0,08667	-0,04333	0,010138	-4,27	0,051
$\text{MgSO}_4$	0,08667	0,04333	0,010138	4,27	0,051
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,25333	0,12667	0,010138	12,49	0,006
Tween 80	0,17000	0,08500	0,010138	8,38	0,014
pH	0,10000	0,05000	0,010138	4,93	0,039
Taux d'inoculum	-0,11333	-0,05667	0,010138	-5,59	0,031
Vitesse d'agitation	0,00217	0,00108	0,000169	6,41	0,023

$$R^2 = 99,45\% \quad R^2(\text{pred}) = 80,16\% \quad R^2(\text{aj}) = 96,97\%$$

## Résultats et discussion

Le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  semble être le facteur le plus influent sur la croissance de la souche suivie par le tween 80 et la vitesse d'agitation avec un effet positif, et par conséquent, ces 03 facteurs font l'objet d'une optimisation poussée. Cependant, le pH est le facteur qui semble être le moins influent avec un effet positif n'est pas retenu. Par ailleurs, le taux d'inoculum qui exerce un effet négatif est également éliminé du plan d'optimisation PCC.

Tous les 4 autres facteurs citrate tri-ammonium,  $\text{MgSO}_4$ , extrait de levure et extrait de viande n'exercent pas un effet sur la réponse et par conséquent ils ne sont pas retenus.

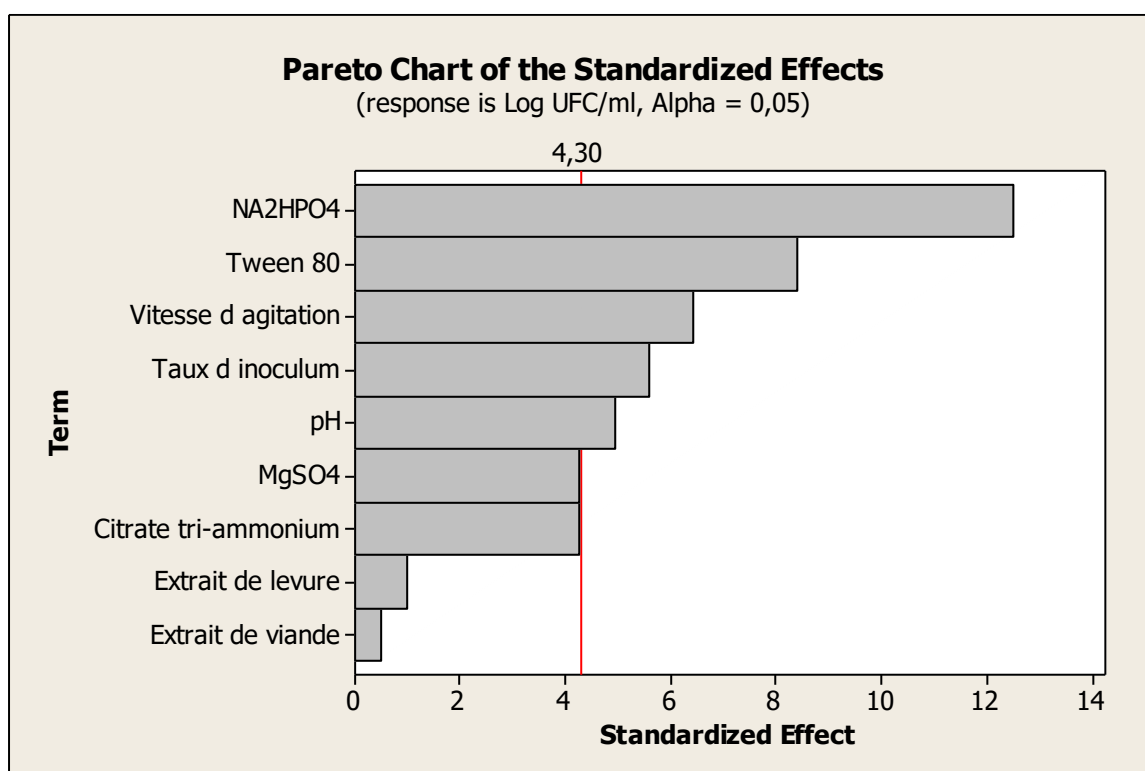


Figure III-12 : diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

## Résultats et discussion

### 5.2. Détermination des optima par le plan composite centré

On se basant sur les résultats obtenus à partir du modèle de Plackett et Burman, trois facteurs : le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $X_1$ ), le tween 80 ( $X_2$ ) et la vitesse d'agitation ( $X_3$ ) sont sélectionnés afin de déterminer leurs concentrations optimales ainsi que les interactions présentes entre ces facteurs. Le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  est utilisé dans une gamme de 0,65-2,34 (g/l) le tween 80 de 0,65-2,34(ml / l) et la vitesse d'agitation de 12,72-147,27 tpm. La matrice d'expériences des variables testées et les résultats expérimentaux du dénombrement sont présentés dans le tableau III-12.

Tableau III-12 : Résultats du dénombrement de *Lactobacillus plantarum* selon le plan composite centré de Box et Wilson.

N° d'essai	X1	X2	X3	Log UFC/ml
1	-1	-1	-1	8,90
2	+1	-1	-1	9,00
3	-1	+1	-1	9,04
4	+1	+1	-1	9,04
5	-1	-1	+1	9,08
6	+1	-1	+1	9,23
7	-1	+1	+1	9,12
8	+1	+1	+1	9,19
9	$-\alpha$	0	0	9,02
10	$+\alpha$	0	0	9,15
11	0	$-\alpha$	0	9,04
12	0	$+\alpha$	0	9,19
13	0	0	$-\alpha$	8,90
14	0	0	$+\alpha$	9,16
15	0	0	0	9,07
16	0	0	0	9,07
17	0	0	0	9,06
18	0	0	0	9,07
19	0	0	0	9,05
20	0	0	0	9,07

## Résultats et discussion

Les coefficients de régression et les valeurs des probabilités ( $P$ ) correspondantes sont représentés dans le Tableau III.13.

Tableau III-13 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lactobacillus plantarum*

Terme	Coef	SE Coef	$t$	$p$
Constante	9,06508	0,005862	1546,353	0,000
$X_1$	0,03944	0,003889	10,140	0,000
$X_2$	0,03165	0,003889	8,138	0,000
$X_3$	0,07888	0,003889	20,281	0,000
$X_1 * X_1$	0,00657	0,003786	1,735	0,113
$X_2 * X_2$	0,01718	0,003786	4,537	0,001
$X_3 * X_3$	-0,01288	0,003786	-3,401	0,007
$X_1 * X_2$	-0,02250	0,005082	-4,428	0,001
$X_1 * X_3$	0,01500	0,005082	2,952	0,014
$X_2 * X_3$	-0,02250	0,005082	-4,428	0,001
$R^2 = 98,52\%$ $R^2$ (pred) = 90,26% $R^2$ (adj) = 97,19%				

## Résultats et discussion

---

L'analyse statistique des probabilités des différents termes ( $P$ ), montre que seulement le coefficient quadratique  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{Na}_2\text{HPO}_4$  est non significatif. Par ailleurs tous les autres coefficients (coefficients linéaires :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , tween 80 et vitesse d'agitation ; coefficients quadratiques : tween 80  $\times$  tween 80 et vitesse d'agitation  $\times$  vitesse d'agitation et coefficients d'interaction  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$  tween 80,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$  vitesse d'agitation et tween 80  $\times$  vitesse d'agitation) sont significatifs.

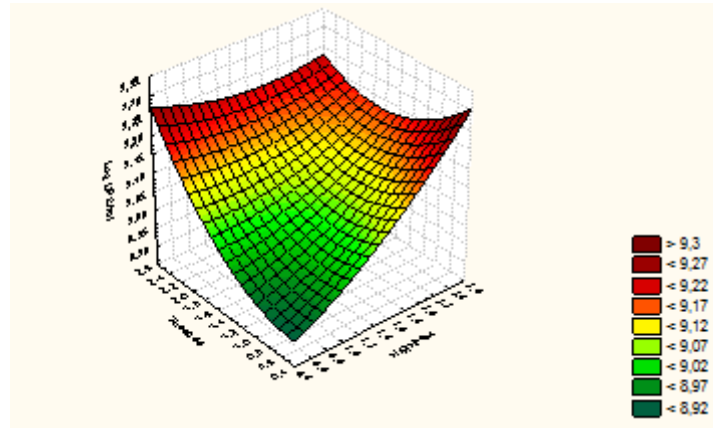
La valeur de  $R^2$  donnée à 98,52% indique toujours la bonne validité du modèle. La valeur de  $R^2$  ajusté (97,19%) dans cette étude préconise une signification élevée du modèle.

La figure III-13 a, b représente l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de tween 80 ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

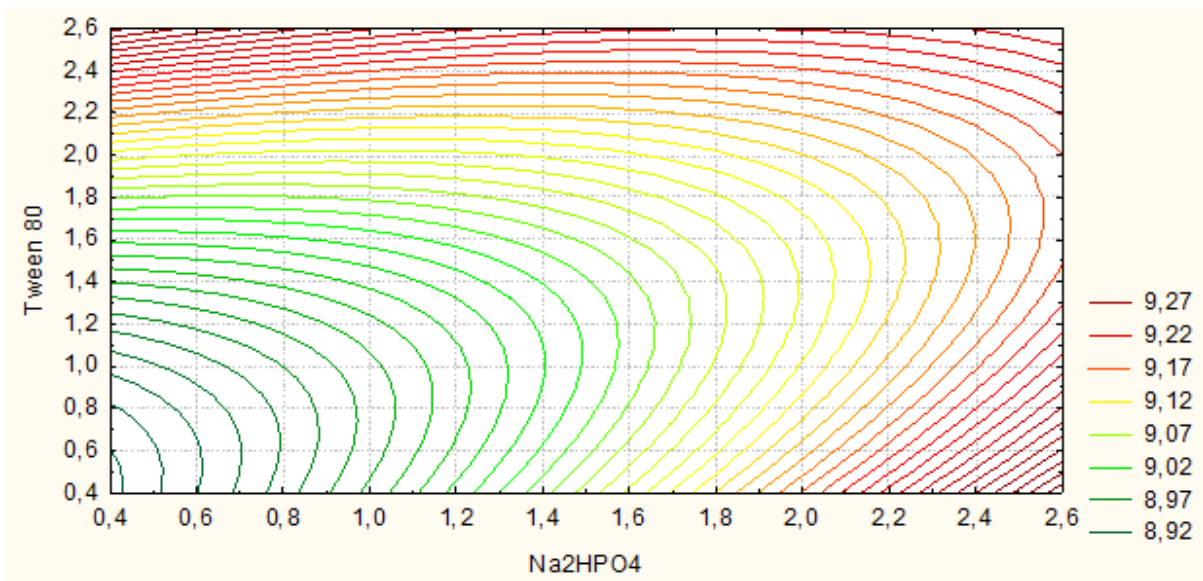
La figure III-14 a, b représente l'effet de tween 80 et de la vitesse d'agitation ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

La figure III-15 a, b représente l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de la vitesse d'agitation ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

## Résultats et discussion



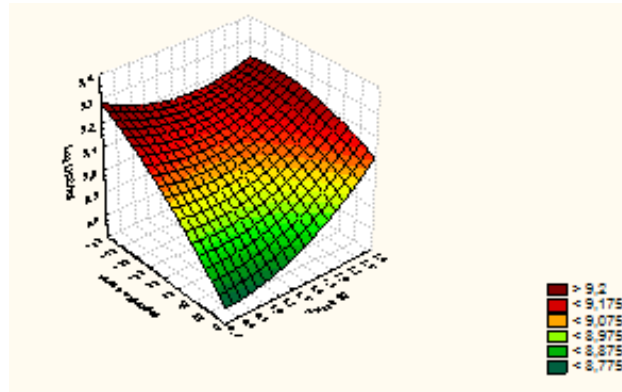
(a)



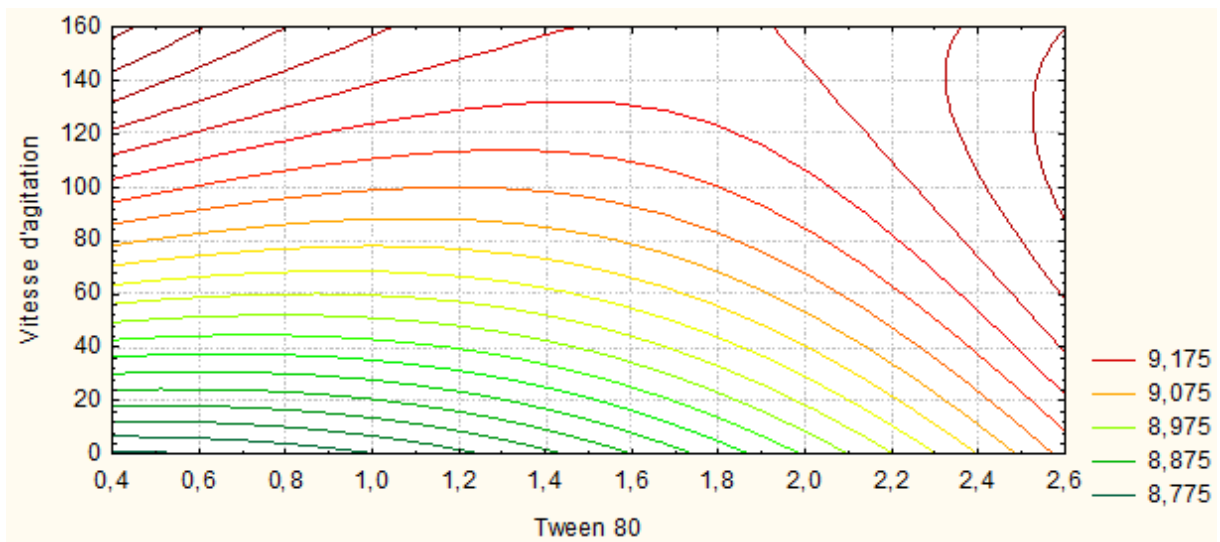
(b)

Figure III.13 a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus plantarum* montrant l'interaction entre le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le tween 80.

## Résultats et discussion



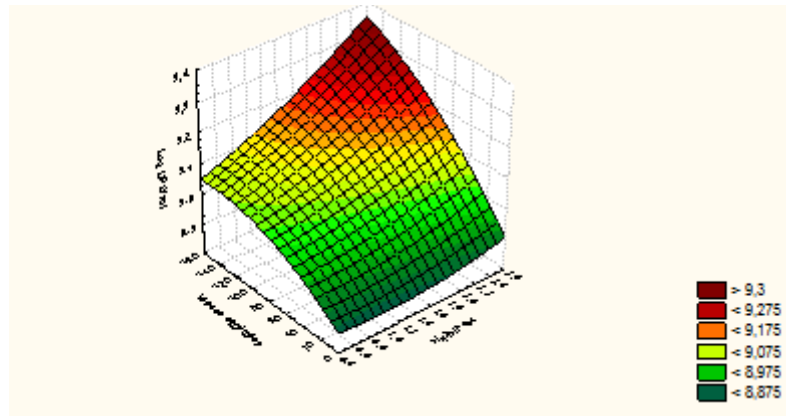
(a)



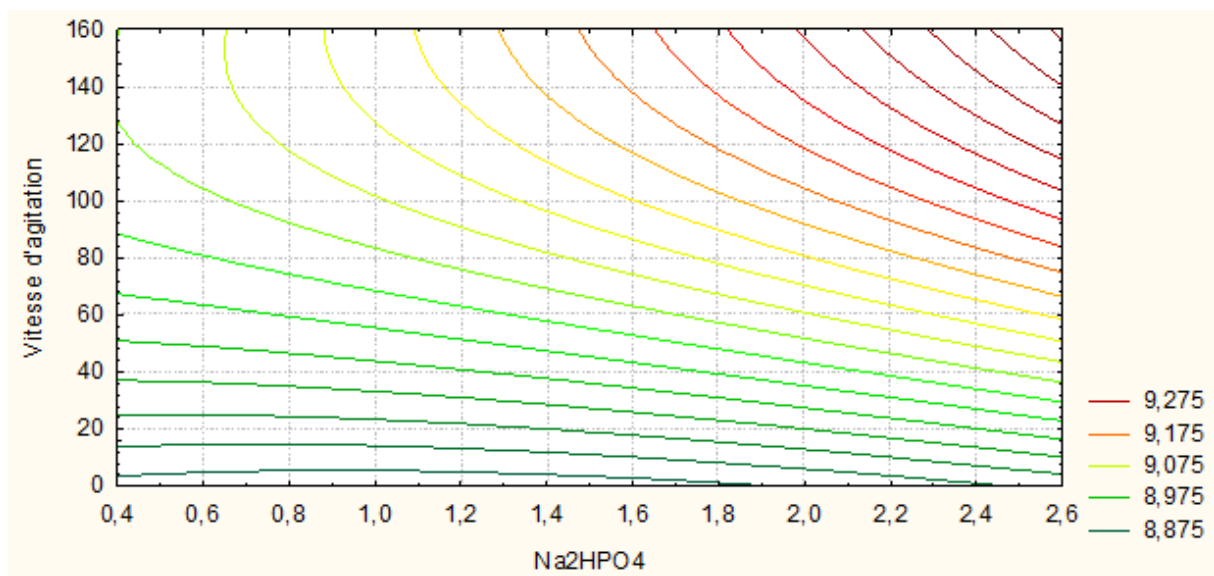
(b)

Figure III.14 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus plantarum* montrant l'interaction entre le tween 80 et la vitesse d'agitation

## Résultats et discussion



(a)



(b)

Figure III.15 a, b (a) : Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus plantarum* montrant l'interaction entre le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et la vitesse d'agitation.

## Résultats et discussion

### 5.3. Validation du modèle

La validation du modèle est réalisée par l'application des conditions théoriques optimales suivantes : l'hydrolysate de lactosérum et de lupin additionné de 2,34 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,65 ml/l de tween 80 et une agitation de 147,47 tpm (milieu HLLNT 2). Sous ces conditions, le nombre de cellule théorique exprimé en log UFC/ml est de 9,41 (figure III-16). Tandis que le nombre obtenu sous ces conditions est 9,35. Les résultats obtenus confirment la validité du modèle de Box et Wilson. Ils montrent aussi que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

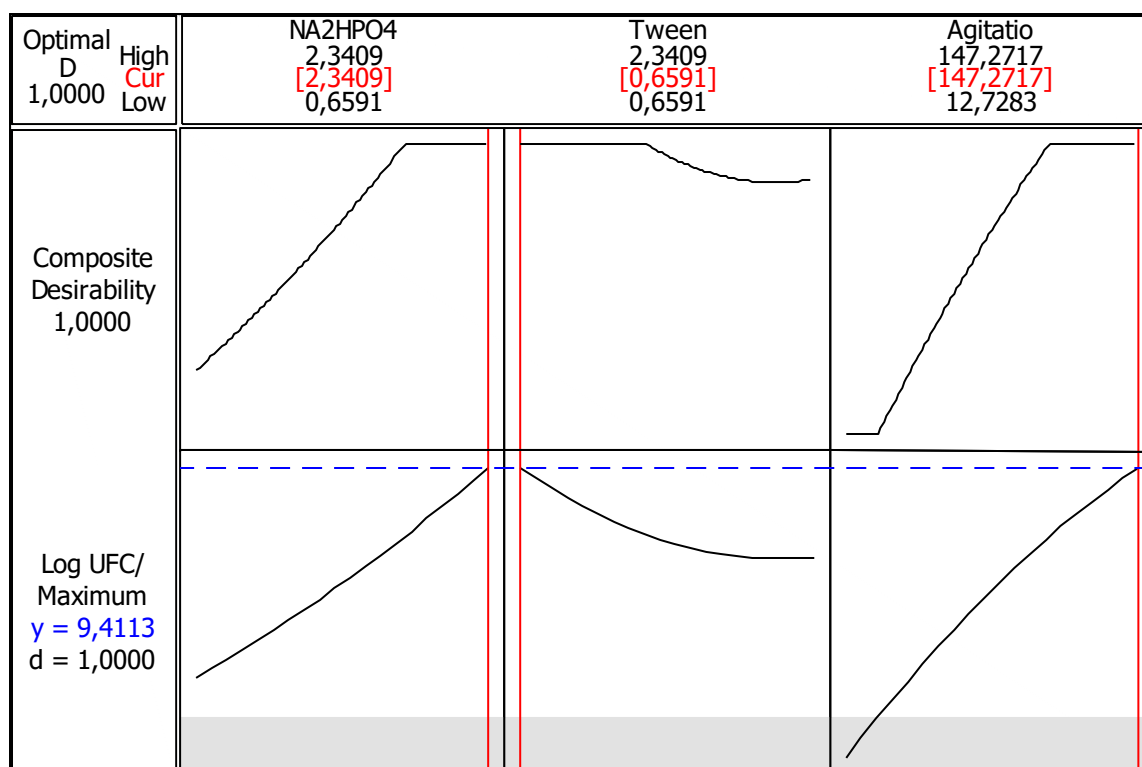


Figure III-16 : diagramme d'optimisation montrant l'effet de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , de tween 80 et de la vitesse d'agitation sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*.

## Résultats et discussion

### 5.4. Cinétiques de croissance de *Lactobacillus plantarum*

Les cinétiques de croissance de *Lactobacillus plantarum* sur les deux milieux (MRS et HLLNT 2), inoculés à 2% sous une agitation de 147,47 tpm sont rapportées dans la figure III-17.

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que la croissance de la souche présente le même profil cinétique sur les deux milieux : phase exponentielle qui débute après 6h et qui dure 8h environ.

Le dénombrement des deux cultures après 24h permet d'atteindre 9,35 log UFC/ml sur milieu HLLNT 2 et 8,90 log UFC/ml sur milieu MRS.

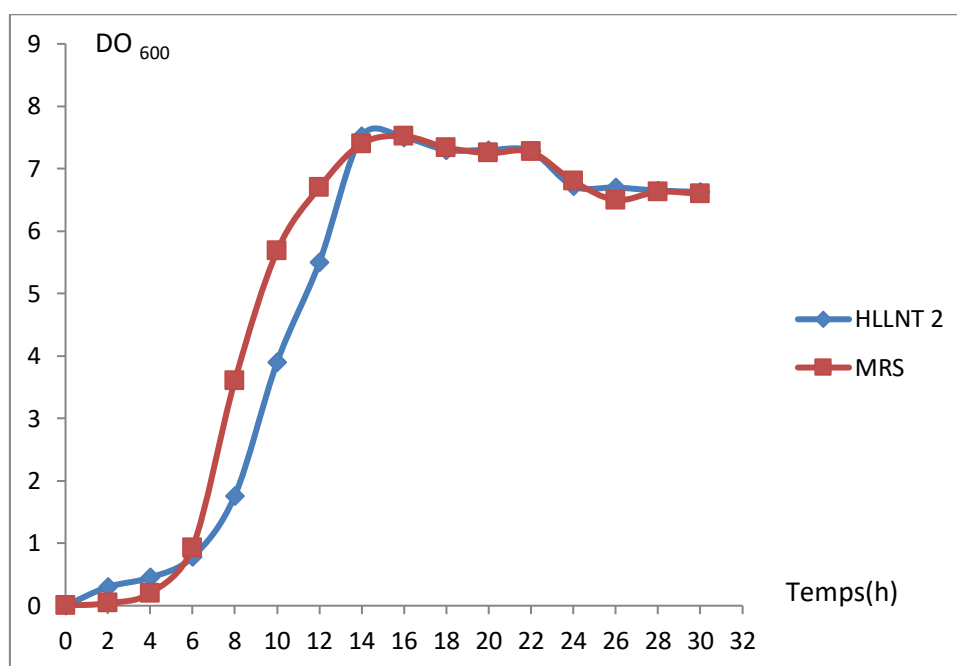


Figure III-17 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus plantarum* sur milieux MRS et HLLNT 2.

## Résultats et discussion

### 6. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*

#### 6.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)

##### 6.1.1. Estimation du potentiel de croissance de *Lactobacillus rhamnosus*

Les résultats du dénombrement des cellules viables de *Lactobacillus rhamnosus* sont mentionnés dans le tableau III-14. Il ressort de ces résultats que la croissance de la souche varie sur les différents milieux. Les valeurs de dénombrement enregistrées sont de 8,32 Log UFC/ml sur le milieu N° 06 à 8, 79 Log UFC/ml sur le milieu N° 11.

Tableau III-14 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).

N° d'essai	Facteurs											Log UFC/ml
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	8,66
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	8,30
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	8,38
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	8,41
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	8,56
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,32
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	8,34
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,38
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	8,74
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	8,51
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	8,79
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,34

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

## Résultats et discussion

### 6.1.2. Traitement et analyse statistique des facteurs étudiés pour la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*

Le traitement des données est effectué par l'étude de la régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16 et le diagramme de Pareto.

On se basant sur les résultats de l'analyse multiple de la régression (tableau III-15) et le résultat de diagramme de Pareto (figure III-18), 6 facteurs (la vitesse d'agitation, le citrate tri-ammonium, le tween 80, le pH, l'extrait de viande et le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) semblent être significatifs avec des valeurs de  $p$  qui correspondent à 0,003, 0,008, 0,008, 0,018, 0,029 et 0,034 respectivement.

Tableau III-15 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.

Terme	Effet	Coef.	SE Coef.	$t$	$p$
Constante		8,35000	0,008975	930,33	0,000
Extrait de levure	-0,05000	-0,02500	0,006346	-3,94	0,059
Extrait de viande	-0,07333	-0,03667	0,006346	-5,78	0,029
Citrate tri-ammonium	-0,14000	-0,07000	0,006346	-11,03	0,008
$\text{MgSO}_4$	-0,03000	-0,01500	0,006346	-2,36	0,142
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,06667	0,03333	0,006346	5,25	0,034
Tween 80	0,14000	0,07000	0,006346	11,03	0,008
pH	0,09333	0,04667	0,006346	7,35	0,018
Taux d'inoculum	0,03667	0,01833	0,006346	2,89	0,102
Vitesse d'agitation	0,00400	0,00200	0,000106	18,91	0,003

$R^2 = 99,73\%$   $R^2(\text{pred}) = 90,37\%$   $R^2(\text{aj}) = 98,53\%$

## Résultats et discussion

Parmi ces facteurs, la vitesse d'agitation, le tween 80, le pH, et le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ont un effet positif et par conséquent les trois premiers facteurs sont choisis pour optimiser leurs concentrations optimales, tandis que l'extrait de viande et le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sont éliminés du plan d'optimisation car ils exercent un effet négatif sur la croissance de la souche.

Tous les autres trois facteurs (extrait de levure,  $\text{MgSO}_4$  et taux d'inoculum) n'ont aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) ainsi, ils seront éliminés du plan d'optimisation PCC.

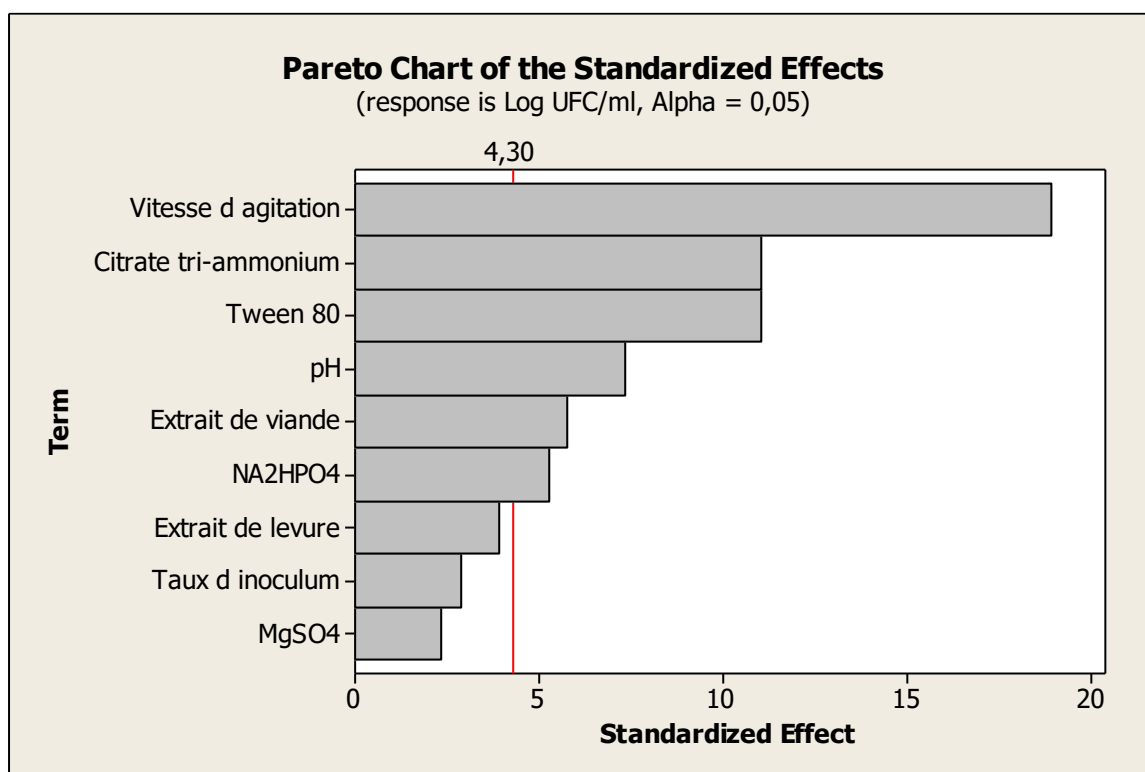


Figure III-18 : diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.

## Résultats et discussion

### 6.2. Détermination des optima par le plan composite centré

On se basant sur les résultats obtenus à partir du modèle de Plackett- Burman, trois facteurs : la vitesse d'agitation( $X_1$ ), le tween 80 ( $X_2$ ) et le pH ( $X_3$ ) sont sélectionnés afin de déterminer leurs concentrations optimales ainsi que les interactions présentes entre ces facteurs. La vitesse d'agitation est utilisée dans une gamme de 28,31- 180, 68 tpm, le tween 80 de 0,65-2,34 (ml / l) et le pH de 4,48-7,01. La matrice d'expériences des variables testées et les résultats expérimentaux du dénombrement sont présentés dans le tableau III-16.

Tableau III-16 : Résultats du dénombrement de *Lactobacillus rhamnosus* selon le plan composite centré de Box et Wilson

N° d'essai	X1	X2	X3	Log UFC/ml
1	+1	+1	-1	9,16
2	-1	+1	-1	9,15
3	0	0	$-\alpha$	8,95
4	-1	+1	+1	9,36
5	0	0	$+\alpha$	9,35
6	-1	-1	+1	9,24
7	0	$-\alpha$	0	9,28
8	+1	-1	+1	9,40
9	0	0	0	9,26
10	$-\alpha$	0	0	9,18
11	$+\alpha$	0	0	9,30
12	0	0	0	9,28
13	0	0	0	9,30
14	0	$+\alpha$	0	9,31
15	+1	-1	-1	9,20
16	0	0	0	9,30
17	0	0	0	9,30
18	0	0	0	9,30
19	-1	-1	-1	9,10
20	+1	+1	+1	9,40

## Résultats et discussion

Les coefficients de régression et les valeurs des probabilités ( $P$ ) correspondantes sont représentés dans le Tableau III-17.

Tableau III-17 : Analyse statistique des résultats du plan composite centré de *Lactobacillus rhamnosus*

Terme	Coef	SE Coef	$t$	$p$
Constante	9,28914	0,009424	985,648	0,000
X <sub>1</sub>	0,03748	0,006253	5,994	0,000
X <sub>2</sub>	0,01321	0,006253	2,113	0,061
X <sub>3</sub>	0,10710	0,006253	17,129	0,000
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-0,01205	0,006087	-1,980	0,076
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	0,00739	0,006087	1,215	0,252
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	-0,04387	0,006087	-7,208	0,000
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	-0,02625	0,008170	-3,213	0,009
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	0,01125	0,008170	1,377	0,199
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	0,01375	0,008170	1,683	0,123
$R^2 = 97,60\%$ $R^2(\text{pred}) = 85,61\%$ $R^2(\text{aj}) = 95,44\%$				

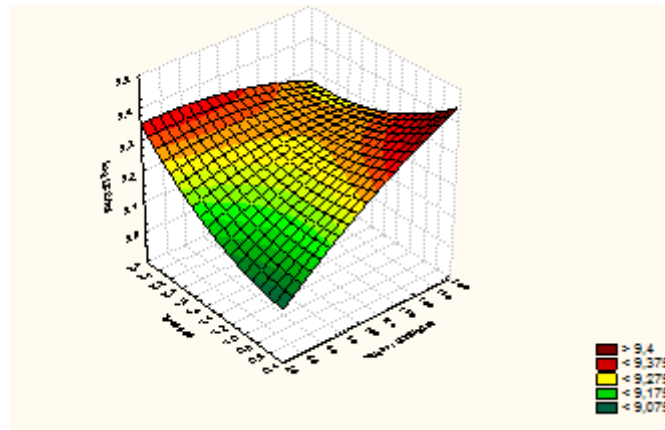
## Résultats et discussion

---

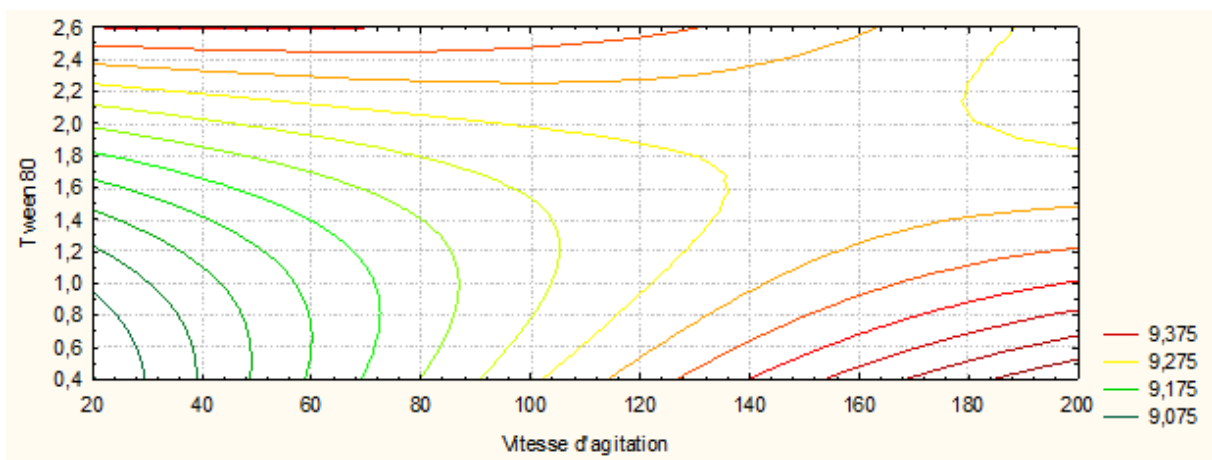
L'analyse statistique des probabilités des différents termes ( $P$ ), permet de conclure les points suivants :

- Les deux coefficients linéaires vitesse d'agitation et pH, le coefficient quadratique pH  $\times$  pH et le coefficient d'interaction vitesse d'agitation  $\times$  tween 80 influent significativement la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.
- Les coefficients d'interaction vitesse d'agitation  $\times$  pH et tween 80  $\times$  pH sont non significatif, et par conséquent la croissance de la souche n'est pas influencée par ces deux interactions.
- La valeur de  $R^2$  donnée à 97,60% indique toujours la bonne validité du modèle). La valeur de  $R^2$  ajusté (95,44%) dans cette étude préconise une signification élevée du modèle.
- La figure III-19 a, b représente l'effet de la vitesse d'agitation et de tween ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.
- La figure III-20 a, b représente l'effet de tween 80 et de pH ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.
- La figure III-21 a, b représente l'effet de la vitesse d'agitation et de pH ainsi que leurs interactions réciproques sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.

## Résultats et discussion



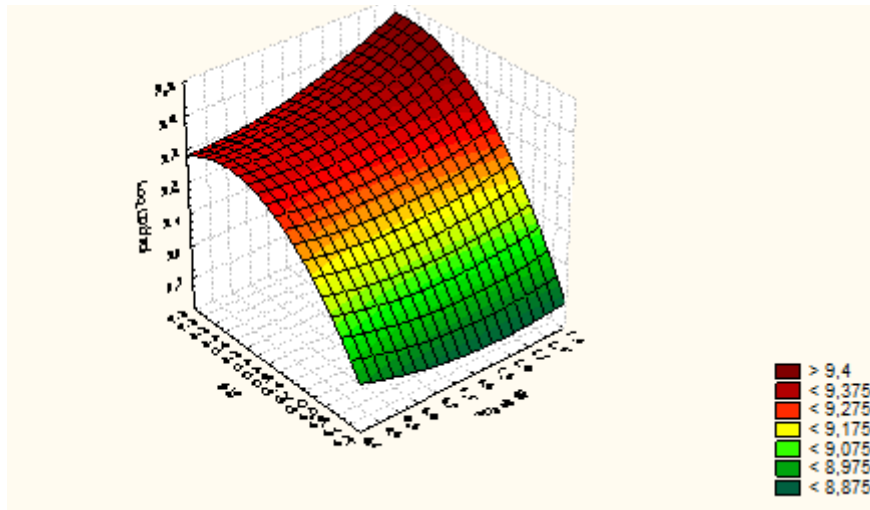
(a)



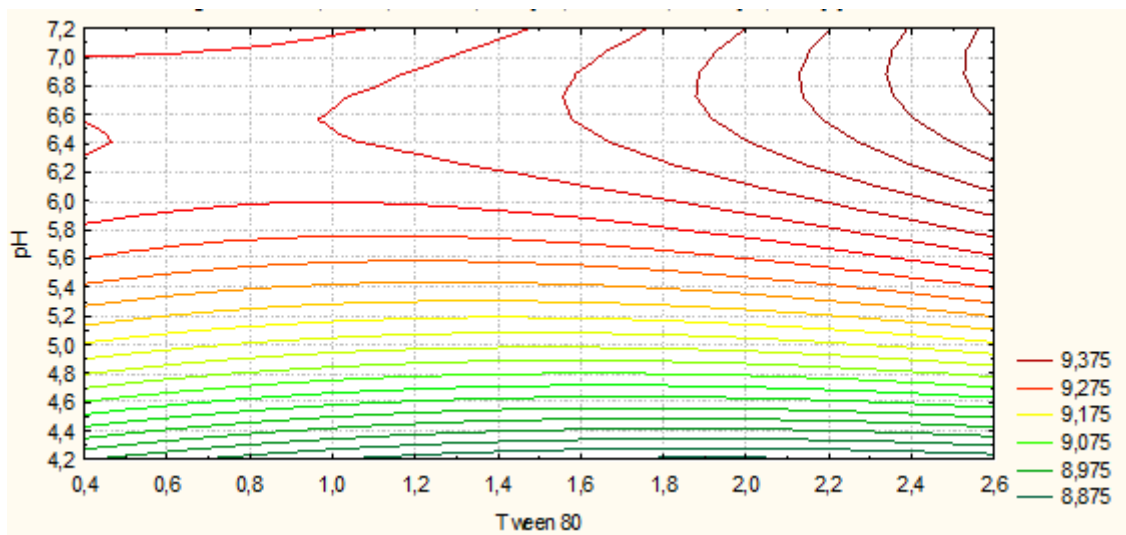
(b)

Figure III.19 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* montrant l'interaction entre la vitesse d'agitation et le tween 80.

## Résultats et discussion



(a)



(b)

Figure III.20 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* montrant l'interaction entre le tween 80 et le pH

## Résultats et discussion

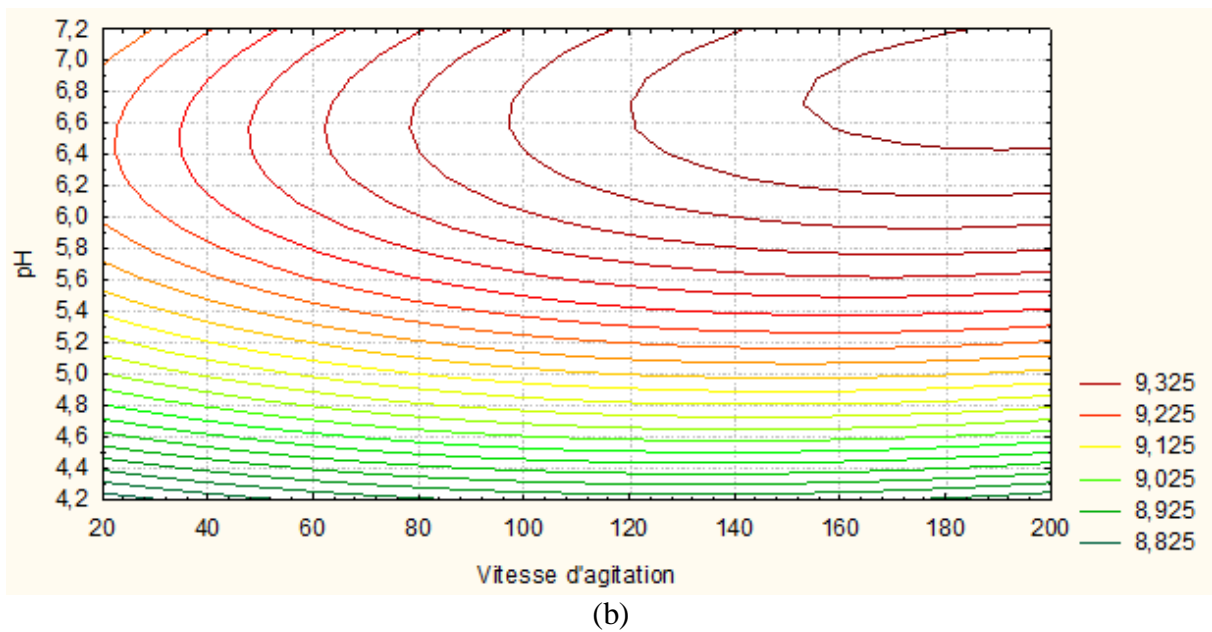
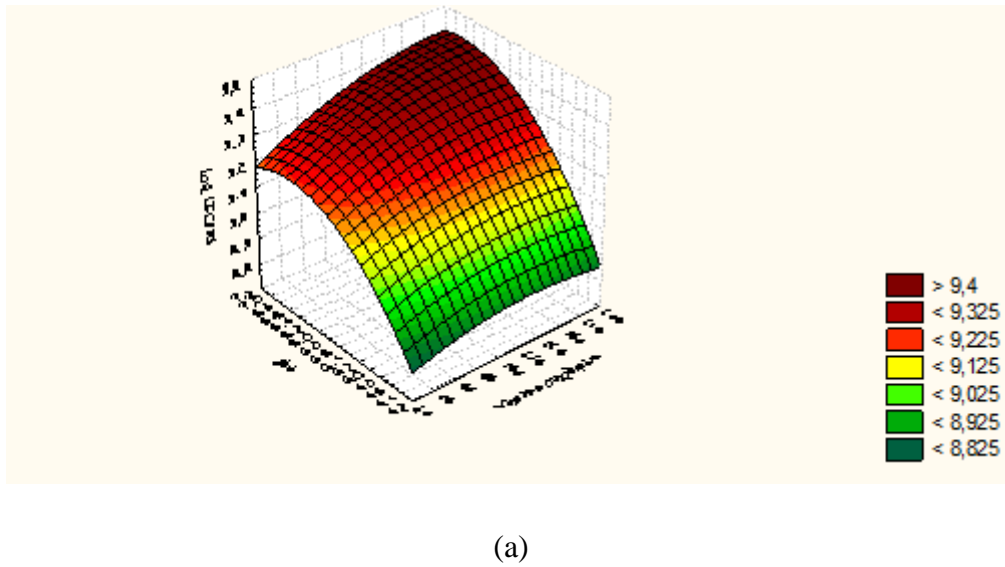


Figure III.21 a, b (a) Graphe tridimensionnel, (b) : Contour plot de la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* montrant l'interaction entre la vitesse d'agitation et le pH

## Résultats et discussion

### 6.3. Validation du modèle

Les résultats de l'optimisation sont confirmés par la culture de la souche sur l'hydrolysate de lactosérum et de lupin additionné de 0,65 ml/L de tween avec un pH ajusté à 6,62 et une vitesse d'agitation de 180,68 tpm (milieu HLLT 2). Sous ces conditions optimales données par le plan de Box et Wilson, le nombre de cellules théorique exprimé en log UFC/ml est de 9,45 (figure III-22). Tandis que le nombre expérimental est de 9,41. Ces résultats confirment la validité du modèle. En effet, la valeur expérimentale est proche de la valeur théorique.

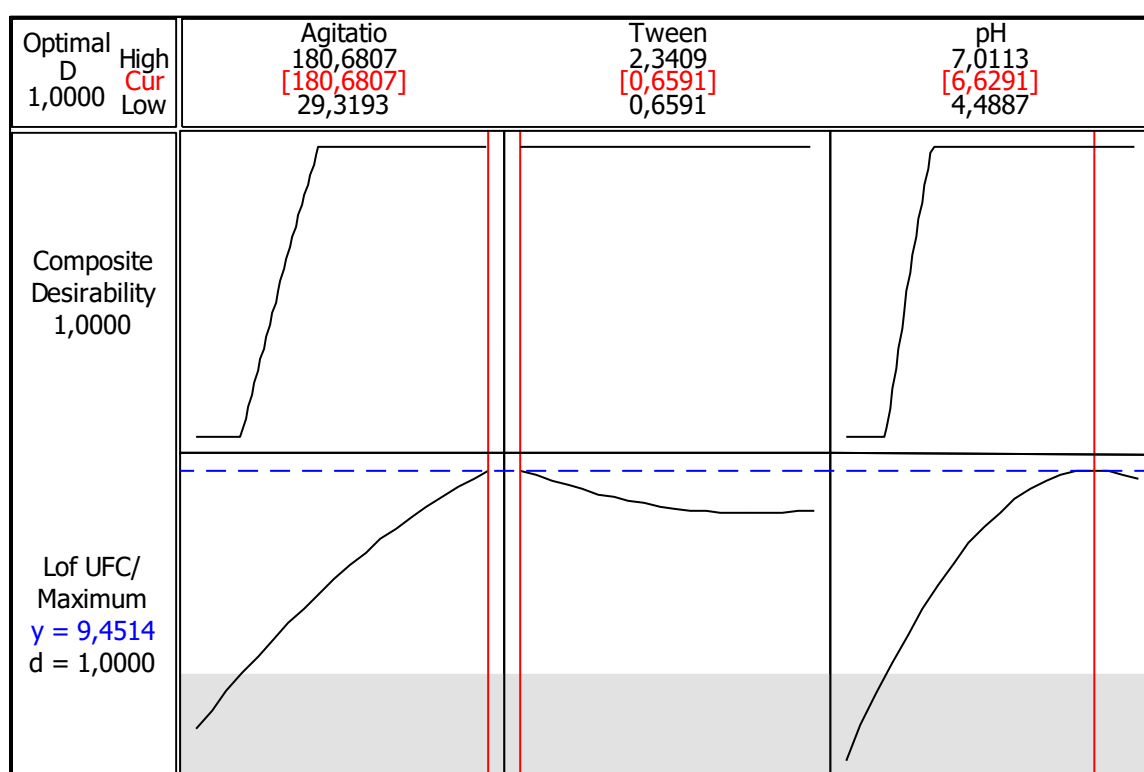


Figure III-22 : diagramme d'optimisation montrant l'effet de la vitesse d'agitation, de tween 80 et du pH sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.

## Résultats et discussion

### 6.4. Cinétiques de croissance de *Lactobacillus rhamnosus*

La figure III-23 permet d'apprécier la cinétique de croissance de la souche *Lactobacillus rhamnosus* sur le milieu élaboré (HLLT 2) en comparaison avec le milieu MRS. Le deux milieux ajustés à un pH de 6,62, sont inoculés à 2% et incubés à 37°C pendant 30h sous une agitation de 180,68 tpm.

La phase de latence sur les deux milieux dure 6 h environ, cependant la croissance de la souche est légèrement supérieure sur le milieu HLLT 2, la croissance augmente sur les deux milieux pendant la phase exponentielle jusqu'à elle atteint un taux de croissance maximal qui correspond à 7,6 unité de DO sur le milieu MRS après 14 h et 7,3 unité de DO sur le milieu HLLT 2 après 16 h d'incubation.

Les deux cultures sontensemencées après 24h d'incubation et le nombre de cellules viables obtenu exprimé en lof UFC/ml correspond à 9, 41 sur milieu HLLT 2 et 9 sur milieu MRS.

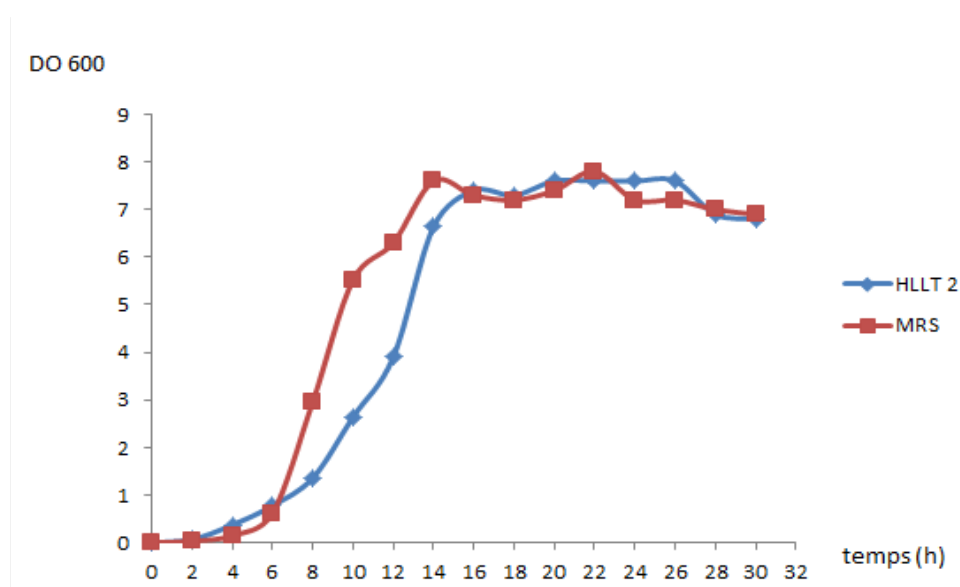


Figure III-23: Cinétiques de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* sur milieux MRS et HLLT 2.

## Résultats et discussion

---

### Discussion

Les besoins nutritionnels des BL sont fastidieux ; leurs milieux de culture doivent être supplémentés par différentes sources d'azote et facteurs de croissance. Parmi ces sources d'azote, l'extrait de levure est le meilleur en raison de sa forte teneur en composés azotés, bases puriques et pyrimidiques et vitamines. Il peut contribuer non seulement à la production élevée de biomasse, mais aussi au métabolisme de l'acide lactique de haut niveau. Cependant, le coût de l'extrait de levure représente environ 38% du coût total de production d'acide lactique, et son coût élevé diminue considérablement le rendement économique de la fermentation de l'acide lactique. Par conséquent, il est important de trouver des sources alternatives d'azote peu coûteuses (Amrane et *al.*, 2000; Liu et *al.*, 2010).

A cet effet, plusieurs sources alternatives d'azote à faible coût ont été testées pour remplacer partiellement ou totalement l'extrait de levure afin de stimuler la croissance des espèces de bactéries lactiques et des probiotiques et d'améliorer la quantité de l'acide lactique produit.

Parmi les travaux précédents qui traitaient ce sujet :

Altaf et *al.* (2005) ont étudié la production d'acide lactique par *Lactobacillus amylophilus* GV6 dans une fermentation en une seule étape en utilisant des substrats riches en amidon. Sept types de suppléments d'azote organique peu coûteux (farine de pois cajan, lentilles rouges, haricot urd (soja noir), pois chiche, grains d'haricot mungo, soja et la levure de boulanger) ont été évalués pour leur potentiel de remplacer les sources d'azote commerciales coûteuses, les peptones et l'extrait de levure. Il ressort de leur étude que les lentilles rouges et les cellules de levure de boulangerie sont les meilleures sources de nutriments alternatives de peptone et d'extrait de levure pour la production d'acide lactique.

Une optimisation de la fermentation acide (+) lactique par *Lactobacillus amylophilus* GV6 sur un milieu qui contient des sources d'azotes alternatives peu coûteuses (lentilles rouges et levure boulangère) et de l'amidon par l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse a été effectuée par Altaf et *al.* (2007).

Le plan composite centré utilisé a permis de déterminer les valeurs optimales de trois variables (lentilles rouges, levure boulangère et période d'incubation) pour atteindre une production d'acide lactique maximale. La quantité d'acide lactique maximale produite est de 13,5 g / 15,2 g d'amidon, a été obtenue avec 0,8% de lentilles rouges, 1% de levure boulangère et une période d'incubation de 48 h, avec une efficacité de rendement d'acide

## Résultats et discussion

---

lactique de 92% (g d'acide lactique produit /g substrat utilisé) et une augmentation de 40% dans la production d'acide lactique (de 50 g à 92 g / 100 g d'amidon utilisé).

Hujanen et *al.* (1996) ont testé l'effet de 11 sources d'azote : l'extrait de levure, germes de malt, peptone, extrait d'herbe, peptone de caséine, liqueur de maïs macéré, hydrolysate de caséine, déchet de distillation,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  et l'urée sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei*. Parmi ces différentes sources d'azote étudiées à 37 ° C, les germes de malt d'orge (88 g / 1 d'acide lactique produit pendant 66 h) et l'extrait d'herbe (74 g/l d'acide lactique produit pendant 73 h) étaient les meilleures sources alternatives économiques.

Ahmed Gaid et *al.* (2016) ont valorisé les intestins de poulet afin de formuler un milieu pour la croissance de *Lactobacillus brevis* CHTD27. A cet effet, une dégradation autolytique des intestins de poulet a été effectuée. Il ressort de leur étude que l'autolysat des intestins de poulet supplémenté avec 19,15 g / L de glucose et 0,25 g / L de citrate d'ammonium permet une bonne croissance de *L. brevis* avec une valeur finale de densité optique à 600 nm de 6,00. La croissance de la souche a été 32% plus élevée que celle observée sur le milieu standard MRS, ce qui peut constituer un milieu alternatif à faible coût pour la production de biomasse de *Lactobacillus brevis*.

Dans le travail rapporté par Kassas et *al.* (2015), *Lactobacillus plantarum* BH 14 a été cultivée sur un milieu à base de figes sèches et de pois cassé supplémenté avec 11.59 g /L glucose, 11.59 g/L lactulose et 0.23 g/l  $\text{MgSO}_4$ , la croissance de la souche a atteint  $3.9 \cdot 10^9$  UFC/ml sur ce milieu et  $2.5 \cdot 10^9$  UFC/ml sur MRS végétal.

Amrane et *al.* (2000) ont évalué la supplémentation de la poudre de perméat de lactosérum par la source azotée d'autolysat des bactéries lactiques pour la fermentation lactique afin de remplacer l'extrait de levure. A travers leur étude, ils ont démontré que la cinétique de croissance de *Lactobacillus helveticus* obtenue sur les deux milieux supplémentés par l'extrait de levure et l'autolysat des bactéries lactiques étaient presque similaire avec des taux de croissance qui correspondent à 0,73 et 0,79 h<sup>-1</sup> respectivement et un taux de croissance de 1,0 g<sup>-1</sup>. Les productivités volumétriques maximales étaient de 2,2 et 2,4g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> sur les deux milieux respectivement avec une quantité produite d'acide lactique de 37 g/l après environ 40 h de fermentation.

Kwon et *al.* (2000) ont utilisé une source d'azote complexe, le soja, supplémenté avec des vitamines comme alternatif de l'extrait de levure pour la production économique d'acide

## Résultats et discussion

---

lactique par *Lactobacillus rhamnosus*. Suite à l'optimisation effectuée, 15 g / l d'extrait de levure pourrait être remplacé avec succès avec 19,3 g / l de Soytone (la peptone papainique de la farine de soja) additionnée de vitamines, ce qui entraîne une production de 125 g / l d'acide lactique à partir de 150 g / l de glucose. La productivité volumétrique et le rendement de lactate étaient de 2,27 g / l / h et 92% respectivement, qui sont plus élevés que ceux avec 15 g / l d'extrait de levure.

Djaghri et *al.* (2007a) ont étudié la croissance de six souches de bactéries lactiques sur un milieu à base de pois et de pois chiche. Il ressort de leur étude que les milieux formulés à base de ces deux protéagineux couvrent les exigences des souches testées, cependant le milieu à base de pois chiche est plus convenable pour la croissance de ces souches lactiques.

L'extrait de féverole a été évalué comme substrat végétal pour remplacer les peptones animales et l'extrait de viande du milieu MRS. Les milieux formulés à base de cet extrait permettent une bonne croissance des sept souches lactiques testées en comparaison avec les milieux standard MRS et M17 (Djaghri et *al.*, 2006)

L'extrait de levure a été remplacé par la liqueur de maïs (Yu et *al.*, 2008), considérée comme une source d'azote à faible coût pour une production économique d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466.

La méthodologie de surface de réponse qui a été impliquée pour déterminer les concentrations optimales de cinq variables (le glucose, les mélasses, la liqueur de maïs, le tween80 et le MnSO<sub>4</sub>) a permis d'atteindre une production maximale d'acide lactique qui correspond à 115.12 g/l en flacons et 110.00 g/l en fermenteur lorsque les concentrations optimales de glucose, mélasses, liqueur de maïs, tween80 et MnSO<sub>4</sub> étaient 118.20 g/l, 37.27 ml/l, 42.54 g/l, 1.52 ml/l and 0.30 g/l, respectivement.

En comparaison avec la production d'acide lactique sur un milieu qui contient l'extrait de levure comme seule source d'azote, la production d'acide lactique sur le milieu optimisé a été augmentée de 30,4%. En outre, le rendement et la productivité volumétrique moyenne de l'acide lactique étaient aussi élevés que 96% et 4,58 g / l h, respectivement

Horn et *al.* (2007) ont évalué le potentiel d'utiliser les peptones de différentes fractions de viscères de morue (chevreuil, laitance, estomacs, et les résidus de foie) comme composant dans les milieux de culture pour les BL. L'étude de la croissance bactérienne a montré que *Lactobacillus plantarum* a bien poussé sur les hydrolysats des différentes fractions,

## Résultats et discussion

---

cependant, la croissance de *Lactobacillus sakei*, une espèce plus exigeante, est inférieure que celle de *L. plantarum* et elle dépend de type d'hydrolysats utilisés.

Djehri et al.(2007b) ont montré qu'une supplémentation du jaune d'œuf délipidé et d'autolysat de levure au lactosérum déprotéiné améliore la croissance des quatre lactobacilles testés.

Soares de Castro et al. (2014) ont démontré que la croissance des cultures mixtes de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* et *Bifidobacteriumlactis*, a été augmentée avec 29,4 et 86,2%, respectivement lors de la supplémentation du milieu de culture avec le mélange des hydrolysats de protéines de lactosérum (1/2) plus blanc d'œuf (1/2) et le mélange des hydrolysats d'isolat de protéine de soja (1 / 2) plus protéines de lactosérum (1/2) à 25,0 mg / mL à 100,0.

Dans le même objectif de diminuer le coût des milieux de culture pour les bactéries lactiques et améliorer le rendement des fermentations lactiques, plusieurs travaux ont été menés afin de substituer la source de carbone par des substrats moins coûteux.

Parmi ces substrats le lactosérum occupe un intérêt primordial grâce à sa forte teneur en lactose et qui représente un sucre fermentescible par les BL.

Un milieu à base de vinasse de blé supplémenté avec 1,77 g / l d'extrait de levure et 10% de mélasse (v / v), et un pH ajusté par l'ajout de NH<sub>4</sub>OH, permet d'atteindre une densité bactérienne de *Lactobacillus plantarum* de (1,6 x 10<sup>10</sup> UFC / ml), ainsi il est suggéré pour être utilisé comme milieu pour de culture à grande échelle pour sa croissance (Krzywonos et Eberhard, 2011).

Dans cette étude, les différents milieux formulés à base de blé, blé germé, lupin, lupin germé et fenugrec présentent un potentiel intéressant pour la multiplication de *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*. Toutefois, la croissance est meilleure sur le milieu lupin pour les deux souches testées.

L'utilisation d'hydrolysats de lactosérum et de lupin conduit à une bonne croissance des quatre lactobacilles testés. Le nombre de cellules viables de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* qui correspond à 9,30 ; 9, 35 et 9, 41 log UFC/ml respectivement, est légèrement supérieur à celui observé sur MRS 9,16 ; 8,90 et 9,00 log UFC/ml respectivement.

## Résultats et discussion

---

Cependant, la croissance de *Lactobacillus fermentum* sur le milieu à base de lactosérum et de lupin est 72.54% supérieure à celle sur MRS, ceci peut être expliqué par son biotope végétal.

Le lactosérum, riche en protéines et en lactose, constitue une excellente source de carbone, en revanche, le lupin, composé par 33,56% de protéines fournit après hydrolyse les acides aminés et des peptides courts requis pour la croissance des souches testées (tableau III-1). Par ailleurs, il contient des sucres de la famille de raffinose et des oligosaccharides (ORP) avec une importance prébiotique qui peuvent améliorer la croissance de certaines souches de bactéries lactiques (Erbaş et al., 2005; Martínez-Villaluenga et al., 2007).

L'utilisation du plan d'expériences de Plackett et Burman permet de sélectionner les facteurs qui affectent positivement la croissance des lactobacilles, il en ressort que la supplémentation avec les deux sources d'azote testées extrait de levure et extrait de viande n'a aucun effet significatif positif, ce qui confirme l'efficacité d'utiliser l'hydrolysate de lactosérum et de lupin comme une bonne source alternative d'extrait de levure et de peptones.

Les résultats de l'analyse statistique montrent l'importance des facteurs suivants pour la croissance des lactobacilles : le tween 80, le pH, la vitesse d'agitation, le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> et le taux d'inoculum. La signification de la plupart de ces facteurs est observée chez plusieurs souches à la fois.

Ces facteurs ont été par la suite optimisés à leurs concentrations optimales par l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse, dans cette étude le plan composite centré de Box et Wilson a été utilisé.

la méthodologie de surface de réponse a été également employée afin d'optimiser les milieux pour la croissance de *Lactobacillus plantarum* BH 14, *Lactobacillus brevis* CHTD27 et *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 (Kassas et al., 2015 ; Ahmed Gaid et al., 2016 ; Dong et al., 2014), la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 sur un milieu à base de liqueur de maïs comme source alternative d'azote (Yu et al., 2008). elle a été également appliquée à la production de diverses enzymes, telles que la cyclodextrine glucanotransférase (CGTase) (Mahat et al., 2004), protéase alcaline (Reddy et al., 2007),  $\alpha$ -amylase (Rao et al., 2003) et lipase (Açikel et al., 2010 ; Papagora et al., 2013), et les vitamines (riboflavine) (Pujari et al., 2000).

## Résultats et discussion

---

### 1. Le tween 80

Le tween 80 affecte la croissance des quatre lactobacilles testés, sa concentration a été optimisée à 1,56 ml/l pour *Lactobacillus fermentum*, 0,67ml/l pour *Lactobacillus brevis*, 0,65ml/l pour *Lactobacillus plantarum*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dong et al. (2014), qui ont montré que le tween80 a un effet significatif bénéfique sur la croissance de *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 et que la concentration des cellules a atteint  $1.79.10^9$  UFC/ml en présence de tween.

Le tween 80 a également un effet significatif sur le maintien de la production d'acide linoléique conjugué *Cis-9, trans-11* par *Lactobacillus acidophilus* F0221 en présence de sels biliaires (sels de sodium de l'acide cholique, l'acide désoxycholique, l'acide chénodésoxycholique, l'acide glycocholique et l'acide taurocholique. Il permet également de maintenir la viabilité de la souche en présence de (sels de sodium de l'acide cholique, l'acide désoxycholique et l'acide chénodésoxycholique (Li et al., 2011).

Lechiancole et al. (2002) ont montré à travers une optimisation du milieu et des conditions de fermentation de *Lactobacillus sakei*, l'effet significatif de tween 80 sur la croissance de la souche a des concentrations entre 0-1ml/l avec un optimum de 0,6ml/l ou la population bactérienne finale atteint  $10^9$ UFC/ml.

Le tween 80 affecte également la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 sur un milieu à base de liqueur de maïs comme source alternative d'azote.

Une concentration optimisée à 1,52 g/ml permet une production maximale d'acide lactique qui correspond à 113.05 g/l (Yu et al., 2008).

L'influence de tween 80 est également rapportée par Naveera et al. (2005) qui ont démontré que le tween-80 a un effet significatif très important sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus amylophilus* GV6 en utilisant le son de blé comme substrat de fermentation. A des concentrations élevées de tween-80, la souche pourrait utiliser certains éléments nutritifs présents dans le substrat solide tandis que, lorsque la concentration de tween-80 est réduite, sa croissance dépend de nutriments supplémentés. Il est rapporté que l'utilisation de Tween-80, un agent tensio-actif, augmente la production d'enzymes.

Le tween 80 améliore également la production de bactériocines (entéroline 1146 produite par *Enterococcus faecium* DPC 1146 et lactocine D produite par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biovar diacetylactis* DPC 3286 (Parente et Hill, 1992).

## Résultats et discussion

---

Le tween-80, qui est un dérivé de l'acide oléique soluble dans l'eau (acide cis-9 octadécénoïque), peut stimuler la croissance d'un grand nombre de BL. La plupart des BL cultivées dans un milieu contenant le tween80 peuvent incorporer l'acide oléique dans leurs membranes, puis le transformer en acides gras cyclopropane. Les acides gras cyclopropanes peuvent agir comme des acides gras poly-insaturés pour augmenter la fluidité de la membrane et protéger les BL contre les mauvais effets de l'environnement tels que les effets délétères de l'oxygène entrant dans la phase de croissance stationnaire et le pH bas provoqué par l'accumulation d'acide lactique. Par conséquent, le tween80, qui peut également remplacer l'exigence de biotine de certaines souches, est considéré comme un facteur stimulant la croissance des BL (Hassinen et *al.*, 1951 ; Partanen et *al.*, 2001; Dong et *al.*, 2014)

### 2. L'agitation

Les fermentations lactiques sont généralement conduites avec une faible vitesse d'agitation du milieu. En effet les BL ne nécessitent pas d'oxygène pour produire leur énergie cellulaire, ce qui ne justifie donc pas l'application des vitesses de rotation élevées. Toutefois, l'agitation reste nécessaire pour l'homogénéisation, le refroidissement et la neutralisation du milieu, en particulier lorsque le neutralisant est apporté sous forme liquide (Béal et *al.*, 2008).

Au cours de cette étude, l'agitation exerce également un effet significatif positif pour la croissance des lactobacilles testés, excepté pour *Lactobacillus fermentum* où cet effet est négatif. Louaileche et *al.* (1993) ont montré que l'agitation est défavorable pour la croissance de trois souches de *Streptococcus thermophilus*, cette dernière diminue d'un facteur 5 lorsque les fioles sont agitées à 150tpm, par rapport à des fioles non agitées. Cet effet pourrait être associé à l'incorporation de l'oxygène dans le milieu (Béal et *al.*, 2008).

Borch et Molin. (1989) ont rapporté que l'oxygène a un effet prononcé sur la croissance et le métabolisme des BL, et que de nombreuses bactéries lactiques se développent bien en aérobiose avec un taux de croissance qui peut même être supérieur à celui en anaérobiose. La présence d'oxygène peut également augmenter le rendement de la biomasse. Cependant, pour certaines bactéries lactiques, l'air est toxique, en raison de l'accumulation de composés oxygénés toxiques qui affectent leur capacité de croissance.

La vitesse optimale est fixée à 147,47 pour *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*, ce qui est concordant avec les recherches de (Chavarri et *al.*, 1988 ; Béal et corrieu, 1994 ; Béal et *al.*, 2008) qui ont rapporté que les vitesses préconisées pour les fermentations

## Résultats et discussion

---

lactiques sont comprises entre 80 tpm et 200 tpm pour les fermenteurs de petite taille et de l'ordre de 20 à 50 tpm pour les bioréacteurs industriels.

Ce résultat est cohérent avec les travaux de Gupta et *al.* (2011) qui ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation de 0 à 100 tpm entraîne une augmentation de 4% en log UFC / ml de *Lactobacillus plantarum* sur un milieu à base d'algues brunes irlandaises comestibles et les travaux de Gamar-Nourani et *al.* (1998) qui ont rapporté qu'une concentration d'oxygène dissous de 10% améliore la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* et conduit à une surproduction d'exopolysaccharide

Tango et Ghaly. (1999) ont également rapporté que la micro-aération améliore d'une manière significative le nombre de cellules et le taux de croissance spécifique de *Lactobacillus helveticus* cultivée sur le lactosérum.

Une production de biomasse maximale de *Lactococcus lactis* (2,93 g / L) a été obtenue également avec une vitesse d'agitation de 100 tours par minute. Cette concentration cellulaire diminue légèrement (2,82 g / L) lorsque la vitesse d'agitation est augmentée à 200 tours par minute (Siti Balkhis et *al.*, 2010).

Fu et Mathews. (1999) ont rapporté également que le taux de croissance cellulaire aérobie de *Lactobacillus plantarum* sur lactose était environ deux fois plus élevé que celui en anaérobiose.

La vitesse d'agitation élevée améliore le transfert du liquide à la masse des particules, et par conséquent une augmentation de la biomasse, l'augmentation du nombre de cellules en présence d'oxygène est due à la production d'ATP supplémentaire générée par le changement du type de métabolisme. Stolz et *al.* (1995) ont rapporté qu'en présence d'oxygène, le métabolisme des souches homofermentaires obligatoires et homofermentaires facultative passe de la production d'acide lactique à la production d'acide acétique, ce qui augmente la quantité d'ATP formée (Gupta et *al.*, 2011). Par ailleurs, l'oxygène, à des concentrations très faibles, est requis par les micro-organismes anaérobies pour la synthèse des lipides nécessaires à la paroi cellulaire (Cysewski et Wilke, 1977).

L'oxygène semble être également nécessaire pour équilibrer l'excès de NADH par l'intermédiaire NADH oxydase chez *Lactobacillus rhamnosus* (Jyoti et *al.*, 2004).

## Résultats et discussion

---

### 3. Le $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  exerce un effet bénéfique sur la croissance de *Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Sa concentration est optimisée à 0,65g/l pour *Lactobacillus brevis*, et 2,34g/l pour *Lactobacillus plantarum*, ce qui concorde avec (Hayek et Ibrahim., 2013), qui ont rapporté que l'ajout de tampons tels que le phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), le citrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) et le phosphate dipotassique ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) dans le milieu de culture est nécessaire pour éviter la baisse du pH due à la production des acides (principalement l'acide lactique) pendant la croissance des BL, car le pH bas ralentit ou inhibe la croissance bactérienne, par conséquent, l'ajout du tampon permet de maintenir le pH approprié pour la croissance des BL.

(Pital et Pital., 2016) ont montré également que l'ajout de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 0.36% a un effet bénéfique sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur un milieu à base de lactosérum.

### 4. Le pH

Le pH initial du milieu affecte la croissance de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*, pour cette dernière, son niveau optimal a été optimisé à 6,62.

L'effet du pH sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* a été également étudié par Polak-Berecka et al. (2010) qui ont montré que le pH optimal pour la croissance de cette souche est de 6,0. Lorsque cette valeur de pH a été maintenue à un niveau constant le rendement de la biomasse obtenu sur un milieu optimal est maximal. Un résultat similaire a été obtenu par Kok et al (2012) avec un pH optimal de croissance de 6, et une activité maximale de l'activité de  $\beta$ -galactosidase à pH 6,5 et un arrêt de la croissance à  $\text{pH} \leq 5$ , cependant un pH optimal de 6, 2 -7, 2 a été retenu par Gamar-Nourani et al. (1998) pour améliorer à la fois la croissance et la production d'exopolysaccharides par *Lactobacillus rhamnosus*.

Par ailleurs, ce pH optimal de croissance semble être plus bas chez *Lactobacillus plantarum* qui montre un taux de croissance maximal à pH 5-6 et une inhibition de croissance à  $\text{pH} \leq 4$  (Fu et Mathews, 1999).

## Résultats et discussion

---

### 5. Le MgSO<sub>4</sub>

Le MgSO<sub>4</sub> montre un effet significatif positif pour la croissance de *Lactobacillus brevis*, ce résultat est en accord avec les travaux de Kassas et al. (2015) qui ont montré que le MgSO<sub>4</sub> influe positivement la croissance de *Lactobacillus plantarum* et les travaux de Pital et Pital. (2016) qui ont rapporté que cet élément affecte la production d'acide lactique sur lactosérum par *Lactobacillus casei*.

Il a été montré également que le Mg<sup>2+</sup> est le seul oligo-élément essentiel pour la croissance de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Lactis*. Le Mg<sup>2+</sup> a également été trouvé un ion métallique essentiel pour la croissance de *Streptococcus thermophilus* (Hayek et Ibrahim, 2013).

L'exigence essentielle de Mg<sup>2+</sup> pour la croissance est en général expliquée par le fait qu'il agit comme activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques (ADN et ARN), hydrolyse des peptides. Il est également essentiel pour les phosphokinases impliquées dans la glycolyse (Boyaval, 1989).

### 6. Le taux d'inoculum

Le taux d'inoculum affecte considérablement la croissance de *Lactobacillus fermentum*, Un taux de 5,25% permet d'atteindre une croissance optimale de la souche.

Un taux d'inoculum de 10% permet également d'atteindre un rendement de biomasse maximale de *Lactobacillus bulgaricus* (Taleghani et al., 2016).

Par ailleurs, un inoculum de 2 à 4% (v / v) pourrait être considéré comme optimal pour une production maximale d'acide lactique par *Lactobacillus casei* (Panesar et al., 2010).

Le choix de la concentration adéquate du taux d'inoculum est nécessaire car, à faible concentration, la phase de latence est prolongée ce qui augmente le temps d'incubation. D'autre part un taux d'inoculum élevé conduira à une croissance compétitive des micro-organismes vis-à-vis du substrat limité (Nagarjun, 2015 ; Taleghani et al., 2016).

## Résultats et discussion

### 7. Optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Lactobacillus farciminis*

#### 7.1. Sélection des variables ayant un effet significatif positif sur la croissance de *Lactobacillus farciminis* en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman (PB)

##### 7.1.1. Estimation du potentiel de croissance de *Lactobacillus farciminis*

Les résultats du dénombrement des cellules viables de *Lactobacillus farciminis* sont mentionnés dans le tableau III-18. Ces résultats montrent que la variation de la croissance sur les différents milieux est importante.

Le dénombrement des cellules viables enregistré sur le milieu N°04 est de 8,81 log UFC/ml, tandis qu'il est de 10,10 log UFC/ml sur le milieu N°11.

Tableau III-18 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats du dénombrement exprimés en log UFC/ml (la réponse).

N° d'essai	Facteurs											Log UFC/ml
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	9,12
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	9,21
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	8,84
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	8,81
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	9,62
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	9,04
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	9,32
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,85
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	9,47
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	9,67
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	10,10
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,91

(+1) : niveau supérieur du facteur

(-1) : niveau inférieur du facteur

## Résultats et discussion

### 7.1.2. Traitement et analyse statistique des facteurs étudiés pour la croissance de *Lactobacillus farciminis*

Le traitement des données est effectué par l'étude de la régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16 et le diagramme de Pareto.

On se basant sur les résultats de l'analyse multiple de la régression (tableau III-19) et le résultat de diagramme de Pareto (figure III-24) et, 8 facteurs (le xylose, le cellobiose, le mannose, le ribose, le rhamnose, le mélibiose, le lactulose et le saccharose) sont significatifs avec des valeurs de  $p$  qui correspondent à 0,000 ; 0,000 ; 0,001 ; 0,000 ; 0,000 ; 0,001 ; 0,002 ; 0,000 respectivement.

Tableau III-19 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la croissance de *Lactobacillus farciminis*.

Terme	Effet	Coef.	SE Coef.	$t$	$p$
Constante		9,1667	0,001667	5500,00	0,000
Arabinose	-0,0033	-0,0017	0,001179	-1,41	0,293
Xylose	0,2167	0,1083	0,001179	91,92	0,000
Cellobiose	-0,5000	-0,2500	0,001179	-212,13	0,000
Mannose	-0,0667	-0,0333	0,001179	-28,28	0,001
Ribose	0,3100	0,1550	0,001179	131,52	0,000
Rhamnose	0,4000	0,2000	0,001179	169,71	0,000
Mélibiose	0,1033	0,0517	0,001179	43,84	0,001
Lactulose	0,0500	0,0250	0,001179	21,21	0,002
Saccharose	0,0027	0,0013	0,000020	67,88	0,000

$$R^2 = 100,00\% \quad R^2(\text{pred}) = 99,93\% \quad R^2(\text{aj}) = 99,99\%$$

## Résultats et discussion

Parmi ces facteurs, le xylose, le ribose, le rhamnose, le mélibiose, le lactulose et le saccharose ont un effet positif et par conséquent une cinétique de la croissance de *Lactobacillus farciminis* est établie sur l'hydrolysats de lactosérum et de lupin additionné de lactulose afin de mieux étudier l'influence de ce sucre sur la croissance de la souche.

En revanche le mannose et le cellobiose exercent un effet négatif sur la croissance de la souche.

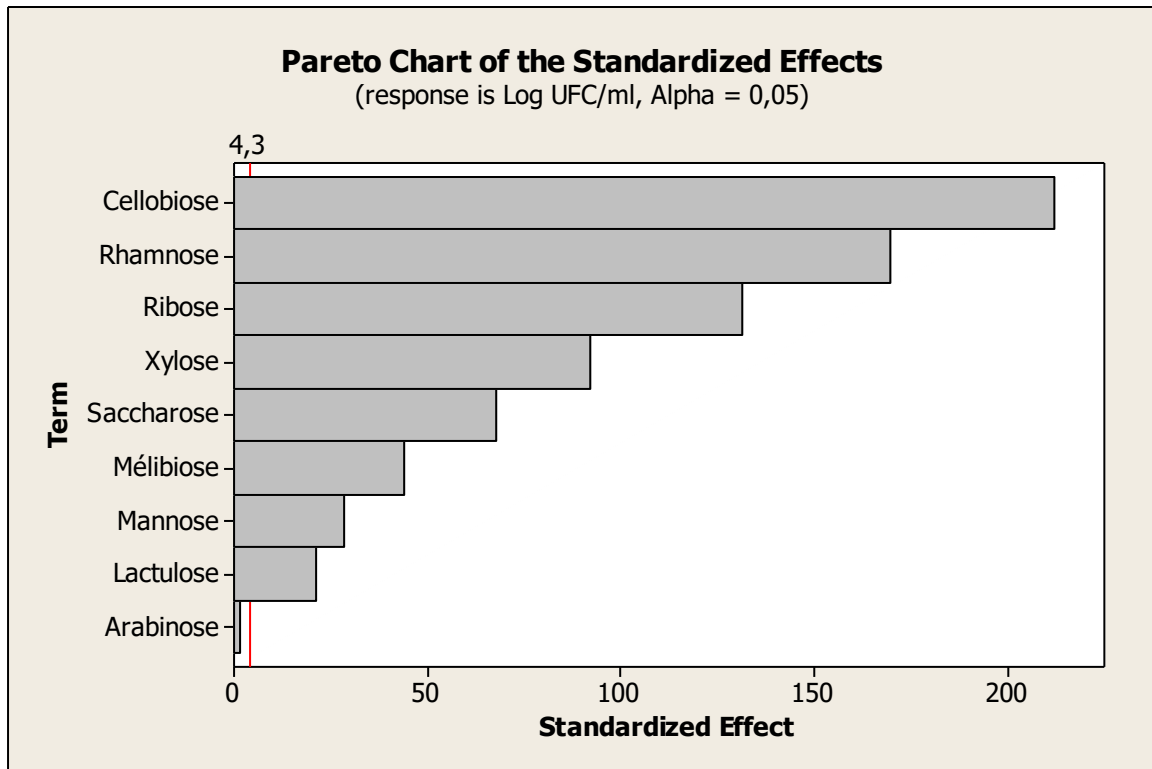


Figure III-24 : diagramme de Pareto montrant l'effet des facteurs étudiés sur la croissance de *Lactobacillus farciminis*.

## Résultats et discussion

### 7.2. Cinétiques de croissance de *Lactobacillus farciminis* sur milieux HLL, HLL-lactulose et MRS

On se basant sur l'analyse de la figure III-25, on peut faire les remarques suivantes :

- la cinétique de croissance de la souche sur les deux milieux HLL et HLL-lactulose est presque similaire, cependant elle est différente de celle observée sur MRS.
- La phase de latence dure 4h sur MRS, tandis qu'elle est absente sur milieu HLL et HLL-lactulose.
- La phase stationnaire débute après 12 h sur les trois milieux avec une croissance maximale légèrement supérieure sur les milieux HLL et HLL-lactulose par rapport au MRS avec des valeurs de  $DO_{600}$  qui correspondent à 1,35 ; 1,33 et 1,26 respectivement.

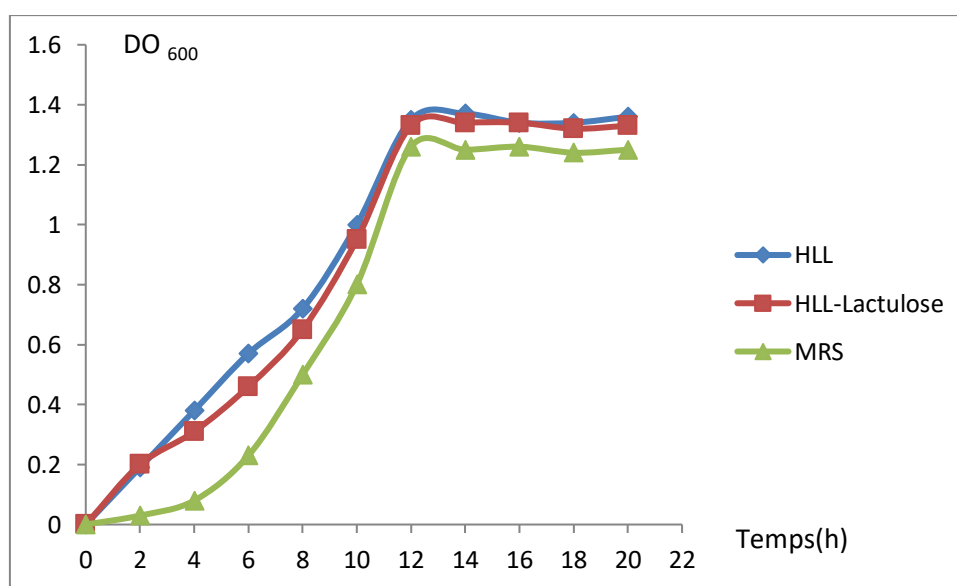


Figure III-25 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus farciminis* sur milieux HLL, HLL-lactulose et MRS.

## Résultats et discussion

---

### Discussion

En raison de leurs bienfaits perçus sur la santé, les probiotiques ont été de plus en plus inclus dans les yaourts et les laits fermentés au cours ces deux dernières décennies. Il s'agit le plus souvent des lactobacilles et bifidobactéries. Un développement majeur des aliments fonctionnels se rapportent à des aliments contenant des probiotiques et des prébiotiques qui améliorent la santé humaine en stimulant la croissance de la flore microbienne dans l'intestin (Saarela et *al.*, 2000). Cependant, la production des probiotiques à grande échelle sur les milieux complexes couramment utilisés au laboratoire pour la croissance des bactéries lactiques tels que MRS, M 17 n'est pas économiquement rentable en raison de leur grande quantité d'éléments nutritifs coûteux tels que l'extrait de levure, les peptones et les sels (Rodrigues et *al.*, 2006).

En outre de nombreuses souches de BL probiotiques ne partagent pas les caractéristiques de bonne croissance des souches exploitées industriellement comme *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ainsi, une attention particulière est nécessaire pour atteindre des concentrations des cellules élevées (Heenan et *al.*, 2002).

De ce fait, plusieurs milieux ont été proposés pour améliorer la croissance des probiotiques :

Rodrigues et *al.* (2006) ont proposé l'utilisation potentielle des milieux de fermentation alternatifs pour la production de biosurfactant par *Lactococcus lactis* 53 et *Streptococcus thermophilus* A. Il ressort de leur étude que les fermentations réalisées sur des milieux formulés à base de lactosérum et de mélasses supplémentés, ont été réalisées de manière efficace avec des rendements et des productivités élevés, et ces milieux peuvent être utilisés comme alternatifs des milieux synthétiques pour la production de biosurfactant par des bactéries probiotiques à faible coût.

Par ailleurs, Helland et *al.*(2004) ont testé la croissance et le métabolisme de quatre lactobacilles probiotiques *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus* (LA5 et 1748) et *Lactobacillus rhamnosus* GG sur le porridge de maïs supplémenté avec le malt d'orge. La plupart des souches ont atteint un nombre maximal de cellules de 7,2 à 8,2 log UFC g<sup>-1</sup> après 12h de fermentation, avec un pH inférieur à 4,0, l'acide lactique a été produit avec des quantités allant de 1360 à 4000 mg kg<sup>-1</sup> en fonction de la souche.

Dans notre étude, l'utilisation d'hydrolysats de lactosérum et de lupin permet une bonne croissance de la souche probiotique *Lactobacillus farciminis*, le nombre de cellules viables

## Résultats et discussion

---

atteint 8,91 log UFC/ml sur l'hydrolysate de lactosérum et de lupin (sans supplémentation de sucres) (tableau III-18). Par ailleurs, avec l'ajout de sources de carbone potentiellement prébiotiques, le nombre de cellules viables augmente jusqu'à 10,10 log UFC/ml, cependant, la majorité des sucres qui influent la croissance ne sont pas métabolisés par la souche.

La cinétique de croissance de la souche sur l'hydrolysate de lactosérum et de lupin, montre que le milieu permet une bonne croissance de la souche en comparaison avec le MRS, ceci peut être expliqué par la présence de différentes sources de carbone dans le lactosérum ; le lactose qui représente le constituant majeur de lactosérum ( tableau III-1), les galactooligosaccharides spécifiques (GOS) obtenus à partir du lactose par réaction enzymatique (transgalactosylation) par l'intermédiaire des micro-organismes utilisés dans la fabrication du fromage et les sialyloigosaccharides du lait naturellement présents dans le lactosérum (Barile et *al.*, 2009).

D'autre part le lupin représente une excellente source d'acides aminés issus après hydrolyse papainique de lupin.

En outre le lupin contient des oligosaccharides de la famille de raffinose (OFR) avec une importance prébiotique qui peuvent améliorer la croissance de certaines souches de bactéries lactiques. Marti'nez-Villaluenga et *al.* (2005) ont montré que l'addition des OFR de lupin blanc au lait augmente les populations de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 et *Lactobacillus acidophilus* à la fin de fermentation par rapport aux témoins. Les produits de fermentation finale sont positivement affectés par l'addition des OFR, et le temps de la fermentation a été réduit de 12 à 10 h. Quand les OFR ont été ajoutés au lait, ils ont été utilisés préférentiellement comme source de carbone (57,7%) par rapport au lactose (23,7%) à la fin de la fermentation.

Dans cette étude, l'addition de lactulose à l'hydrolysate de lactosérum et de lupin n'améliore pas la croissance de la souche, ceci peut être expliqué par l'inaptitude de la souche à le métaboliser, ou par la présence de lactose comme source de carbone utilisée préférentiellement que le lactulose. Ce résultat est en accord avec les travaux de Matijević et *al.* (2009) qui ont montré que le lactulose, comme un prébiotique bien défini n'a pas d'effet significatif sur la fermentation et la survie de *Lactobacillus acidophilus* La-5 et *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 dans le lactosérum, indépendamment de la quantité ajoutée. Cependant, l'effet stimulant de la croissance de *Bifidobacterium* attribué au lactulose a été trouvé il y a près de 50 ans. Dans les études réalisées dans les années 1960 et 1970, la bifidogénicité du lactulose a été montrée chez des bébés nourris au lait. Plus récemment, la capacité de lactulose à soutenir la croissance des bactéries intestinales a été

## Résultats et discussion

---

plus largement étudiée. En plus de *Bifidobacterium*, certaines espèces de *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Peptostreptococcus* sont capables de métaboliser le lactulose largement in vitro (Saarela et al., 2003).



**Conclusion**

## Conclusion

---

### Conclusion

Dans cette étude, un hydrolysate de lactosérum et de lupin a été utilisé comme milieu de base dans la formulation de milieux de culture pour la croissance de cinq souches de lactobacilles. Par ailleurs l'effet de l'ajout de sources de carbone potentiellement prébiotiques sur la croissance d'une souche probiotique de *Lactobacillus farciminis* pour former des combinaisons symbiotiques a été étudié. Une étude de la composition de l'hydrolysate de lactosérum et de lupin utilisé pour la préparation des milieux de culture fait apparaître une forte teneur en protéines (56,66%), un taux de sucres totaux de 31,65% et un taux de cendre de 4%.

Une optimisation de la composition finale des milieux a été effectuée en réalisant les expériences dans le cadre de deux plans : le premier plan d'expériences de Plackett et Burman pour la sélection des facteurs de croissance ayant un effet significatif et le second plan composite centré pour la détermination des optima.

L'analyse statistique des résultats du premier plan (matrice de Plackett et Burman) a permis de sélectionner le tween 80, le pH, la vitesse d'agitation, le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  et le taux d'inoculum comme facteurs significatifs sur la croissance de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* et le xylose, le ribose, le rhamnose, le mélibiose, le lactulose et le saccharose comme sources de carbone qui influent positivement la croissance de *Lactobacillus farciminis*. L'application du deuxième plan (de Box et Wilson) suivi du calcul des optima des facteurs sélectionnés a permis d'établir la composition finale des milieux et de déterminer les niveaux optimaux des facteurs physiques comme suit : 1,56 ml / l de tween inoculé à un taux de 5,25% pour *Lactobacillus fermentum*, 0,65g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,67ml/l de tween 80 et une vitesse d'agitation de 147,47 tpm pour *Lactobacillus brevis*, 2,34 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,65 ml/l de tween 80 et une agitation de 147,47 tpm pour *Lactobacillus plantarum* et 0,65 ml/L de tween avec un pH ajusté à 6,62 et une vitesse d'agitation de 180,68 tpm pour *Lactobacillus rhamnosus*.

Sous ces conditions optimales, la croissance de *Lactobacillus fermentum* sur le milieu à base de lactosérum et de lupin était 72.54% supérieure à celle sur MRS avec des valeurs de l'absorbance à  $\text{DO}_{600}$  qui correspondent à 7,04 sur le milieu formulé et 4,08 sur milieu MRS. Par ailleurs, Le nombre de cellules viables de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* qui correspond à 9,30 ; 9, 35 et 9, 41 log UFC/ml respectivement

## Conclusion

---

sur les milieux formulés, était légèrement supérieur à celui observé sur MRS 9,16 ; 8,90 et 9,00 log UFC/ml respectivement.

La cinétique de croissance de la souche probiotique de *Lactobacillus farciminis* sur l'hydrolysate de lactosérum et de lupin montre que le milieu permet une bonne croissance de la souche en comparaison avec le MRS, cependant, l'addition du lactulose au milieu n'a pas amélioré la croissance de la souche.

Enfin, ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

- ✓ Etudier le potentiel des milieux optimisés pour la croissance d'autres souches (streptocoques et lactocoques).
- ✓ Déterminer la composition du lupin en acides aminés.
- ✓ Tester la production d'acide lactique sur les milieux optimisés.
- ✓ Etudier la production des bactériocines sur les milieux formulés.



## **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- Açikel , Ü., Erşan, M et Sagç Açikel, Y., 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. Food and bioproducts processing. 88:31–39.
- Ahmed-Gaid; K., Boukhemis, M et Djeghri-Hocine, B., 2016. A low cost medium containing chicken intestine autolysate for *Lactobacillus brevis* Growth: Statistical Optimization. Advance journal of food science and technology. 10(9): 642-647.
- Aïnouche, A. K et Bayer R. J., 1999. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Amer. J. Bot. 86: 590–607.
- Altaf, M., Naveena, B.J et Reddy, G., 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. Bioresource Technology 98: 498–503.
- Amrane, A., 2000. Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 16:207-209.
- Axelsson, L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology of lactic acid bacteria. In : Salminen, S ., Wright, A.V et Ouwehand, A. lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspects. 3<sup>ème</sup> edition Marcel Dekker, Inc. P: 1-66.
- Ballester, D., Yanez, E., Garcia, R., Erazo,S., Lopez, F., Haardt, E., Cornejo, S., Lopez , A., Pokniak, J et Chicheste, C., 1980. Chemical Composition, Nutritive Value, and Toxicological Evaluation of Two Species of Sweet Lupine (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*) J. Agric. Food Chem. 28: 402-405.
- Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C.B., Coisson, J.D., Arlorio, M et German, J. B., 2009. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. International Dairy Journal 19 : 524–530.
- Béal, C., Louvet, P et Corrieu, G., 1989. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 148-154.
- Béal, C., Martin, M., Fantaine, E., Fancseca, F et Obert, J. P., 2008 .Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques in Corrieu, G et Luquet, F.M. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec et Doc Lavoisier. Paris. P: 661-766.

## Références bibliographiques

---

- Bekal, S., Belguesmia, Y., Drider, D., Prévost, H.,** 2009. Métabolisme des bactéries lactique, le citrate In Drider, D., Prevest, H .Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme et applications industrielles. Economica. P : 51- 67.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S et Guéguen., M.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. International Journal of Food Microbiology 126: 278–285.
- Bonvallot, V.,** 2004. Des plantes au service de la dépollution. *Biofutur*, 23(242), 29-31.
- Boyaval, P., 1989. Lactic acid bacteria and metal ions. *Le Lait*. 69 (2):87-113.
- Butlatović, M.L., Rakin, M.B., Vukašinović-Sekulić, M.S., Krunić, T.Z.,** 2014. Effect of nutrient supplements on growth and viability of *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 in whey. International dairy journal. 34, 109-115.
- Canteri, G.,** 1997. Les agents de transformation de lait. In : Eck, A et Gillis G. C. Le fromage : de la science à l'assurance qualité, 3<sup>ème</sup> édition Tec et Doc Lavoisier. P : 175-195.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Viviana Suárez, V., et Reinheimer, G.,** 2010. Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations. In: Mozzi, F., Raya, R. R et Vignolo, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. Wiley Blackwell. P: 177-192.
- Carr, F.J., Don Chill, D et Maida, N.,** 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiology. 28(4):281–370.
- Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jimenez-Colmenero, F., Ragagnin de Menezes, C et Fries, L. L. M.,** 2015. Application of probiotic delivery systems in meat products. Trends in Food Science & Technology. 46:120-131.
- Champ, M., Magrini, M.R., Simon, N et Le Guillou, C.,** 2015. Les légumineuses pour l'alimentation humaine : apports nutritionnels et effets santé, usages et perspectives in Schneider, A., Huyghe, C. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables Éditions Quæ. P : 263- 373.
- Champagne, C.P et Arora, G.,** 2009. Production industrielle. In Drider, D., Prevest, H. Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme et applications industrielles ECONOMICA. P : 594- 573.

## Références bibliographiques

---

- Chango, A., Villaume, C., Bau, H. M., Nicolas, J.P.,** 1995. Fractionation by thermal coagulation of lupin proteins: physicochemical characteristics. *Food Research International*. 28, 91-99.
- Cysewski, G. R et Wilke C.R.,** 1977. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnology Bioengineering*, 19: 1125–1143.
- Dacosta, Y.,** 2000. Bioprotection des aliments, l'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques. Edition Yves Dacosta .P : 1-2.
- Davis, C.,** 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 103:9–17.
- De Roissart, H et Luquet, F. M.,** 1994. Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Edition Lorica, Lavoisier. P : 161.
- De Roissart, H.,** 1986. Les bactéries lactiques. In : Luquet F. M. le lait et les produits laitiers. Tome 3. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris. P: 343-407.
- Delarras, C.,** 2007. Microbiologie pratique pour les laboratoires d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC et DOC. Lavoisier
- Delarras, C.,** 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition TEC et DOC. Lavoisier. Paris. P : 66-67-111.
- Dervas, G., Doxastakis, G., Zinoviadi, S et Triandatafillakos. N.,** 1999. Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chem.*, 66: 67-73.
- Dervas, G., Doxastakis, G., Zinoviadi, S., Triandatafillakos, N.,** 1999. Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chemistry*. 66, 67–73.
- Desmazeaud, M.,** 1990. Le lait milieu de culture. *Microbiol Alim Nutri*. 8 : 313-325.
- Desmazeaud, M.,** 1992. Les bactéries lactiques. in Hermier, J., lenoir, J et Weber, F. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. P: 9-59. Edition CEPIL
- Desmazeaud, M.,** 1997. Le lait de fromagerie. In : Eck, A et Gillis G. C. Le fromage : de la science à l'assurance qualité, 3<sup>ème</sup> édition Tec et Doc Lavoisier. P : 203-227.
- Desmazeaud. M.,** 1983a .Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. La technique laitière. 976 : 11-18.

## Références bibliographiques

---

- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M. and Amrane, A.,** 2010. Formulation and Evaluation of a selective medium for Lactic Acid Bacteria-validation on some dairy products. *American Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5 (2), 184-153.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N., Amrane, A.,** 2006. Horse Bean Extract for the Supplementation of Lactic Acid Bacteria Culture Media. *J. Food Technol.* 4 (4), 299-302.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N., Amrane, A.,** 2007 a. Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea- and chickpea-based media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (6), 765-769.
- Djaghri-Hocine, B., Boukhemis, M., Zidoune, N., Amrane, A.,** 2007 b. Evaluation of de-lipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol.* 60 (4), 292-296.
- Dong, Z., Lei Gu, L., Zhang, J., Miao Wang, M., Du, G., Chen, J., Li, H.,** 2014. Optimisation for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. *International Dairy Journal*. 34, 230-236.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A et Ramadan, M.F.,** 2016. Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Sci Technol.* 74(3): 625-38.
- Erbas, M., Certel, M et Uslu, M.K.,** 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chem.* 89: 341-345.
- Fernando Gonza´lez-Andre´s, F., Casquero, P.A., San-Pedro, C et Herna´ndez-Sa´nchez, E.,** 2007, Diversity in white lupin (*Lupinus albus* L) landraces from north west Iberian plateau *Genetic Resources and Crop Evolution.* 54:27–44
- Ferval, M.,** 2014. Des outils moléculaires aux outils biochimiques : caractérisation des relations de parenté au sein du genre *Lupinus* (Fabaceae) avec une attention spéciale sur le complexe *L. montanus* au Mexique. Thèse de doctorat en écologie fonctionnelle. Université de Toulouse. France.

## Références bibliographiques

---

- Fu, W, Mathews, A.P.,** 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 3, 163–170.
- Fung, W, Y., Lye, H. S., Lim, T. J., Kuan, C. Y et Liong, M.T.,** 2011. Roles of Probiotic on Gut Health. In: Liong, M.T. *Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects.* Springer. P: 140-160.
- Gamar-Nourani, L., Blondeau, K et Simonet, J. M.,** 1998. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology.* 85: 664–672.
- Gänzle, M.G.,** 2015. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science.* 2, 106–117.
- Georgiva, R., Koleva, D., Nikolova, D., Yankov, D., Danova, S.,** 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnol & Biotechnol.* 23, 861-865.
- Guiraud, J.P.,** 2003. *Microbiologie alimentaire.* Dunod. P: 178.
- Gulewicz, P.,** Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Ciesiołka, D., Gulewicz, K et Vidal-Valverde, C., 2008. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chem.* 107: 830-844.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, Net G.M. Scannell, A.G.M.,** 2011. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. *Food and Bioproducts Processing* 89 (4): 346–355.
- Hanoune, S., Djeghri-Hocine, B., Kassas, Z., Derradji, Z., Bousour, 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.
- Hassinen, J., Durbin, G., Tomarelli, R., Bernhart, F.,** 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *Journal of Bacteriology.* 62, 771-777.
- Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W., Fleet, G.H.,** 2002. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35 : 171–176.
- Helland, M.H., Wicklund, T et Narvhus, J.A.,** 2004., Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in maize porridge with added malted barley. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 305-313.

## Références bibliographiques

---

- Horn, S.J., Aspino, S.I., 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.
- Hujanen, M., Linko, Y.Y.,** 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 45, 307-313.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P et Brulé, G.,** 2008 : Les produits laitiers 2eme édition Tec et Doc Lavoisier. Paris. P: 157.
- Juárez Tomás, M.S., Bru, E., Wiese, B., Nader-Macías, M.E.F.,** 2010. Optimization of low-cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a urogenital *Lactobacillus salivarius* Strain. *Probiotic & Antimicro.Prot.* 2, 2-11.
- Juillard V, Foucaud, C., Desmazeaud, M et Richard, J.,** 1996. Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Lait*. 76 : 13-24.
- Jyoti, B.D., Suresh, A.K., Venkatesh, K.V.,** 2004. Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. *Microbiological Research* 159: 35–42.
- Kanuspayeva, G.,** 2007. Variabilité physico-chimique et biochimique du lait des grands camélidés (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* et hybrides) au Kazakhstan. Thèse de doctorat en science des aliments. Université de Montpellier II, France.
- 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.
- Kojima, Y., Ohshima, T., Seneviratne, C. J et Maeda, N.,** 2015. Combining prebiotics and probiotics to develop novel synbiotics that suppress oral pathogens. *J Oral Biosci*. 58 (1): 27-32.
- Kok, F. S., Muhamad, I. I., Lee, C. T., Razali, F., Shaharuddin, N. Pa'e, S.,** 2012. Effects of pH and Temperature on the Growth and  $\beta$ -Glucosidase Activity of *Lactobacillus Rhamnosus* NRRL 442 in Anaerobic Fermentation. *International Review of Chemical Engineering (I.RE.C.H.E.)*, 4(3): 293-299.

## Références bibliographiques

---

**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 ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol14-issue2-fulltext-10.

**Kwon,S., Lee, P.C., Lee,E.G., Chang,Y.K., Chang,N.**, 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology. 26, 209–215.

**Larpent J.P.**, 2000 .Introduction à la nouvelle classification bactérienne « les principaux groupes bactériens ». Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris. P: 173, 180, 182.

**Lechiancole, T., Ricciardi, A et Parente,E.**, 2002. Optimization of Media and Fermentation Conditions for the Growth of *Lactobacillus sakei*, Annals of Microbiology. 52: 257-274.

**Leclerk. H.**, 1975. Microbiologie générale. Edition Doin. P : 106.

**Le coq R.**, 1965. Manuel d'analyse alimentaires d'expertises usuelles. Doin. Paris.

**Lee, H.M et Lee, Y.**, 2008. A differential medium of lactic acid-producing bacteria in mixed culture. Letters in Applied Microbiology. 46, 676-681.

**Li, J.Y., Zhang, L.W.,, Du.M., Han, X., Yi, H.X., Guo, C. F., Zhang, Y. C., Luo,X., Zhang, Y. H., Shan, Y. J. et Hou, A. J.**, 2011. Effect of Tween Series on Growth and *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid Production of *Lactobacillus acidophilus* F0221 in the Presence of Bile Salts. International journal of molecular sciences. 12: 9183-9154.

**Liu, B., Yang, M., Qia, B., Chena, X., Sua, Z et Wana,Y.**, 2010. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. Biochemical Engineering Journal. 52, 212–219.

**Louaileche, H., Bracquart, P., Saulnier, F., Desmazeaud, M et Linden, G.**, 1993. Carbon dioxide effects on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. Journal of Dairy Science. 76, 3683–3689.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 270, 27299–27304.

**LPGW**, 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. Taxon 62, 217-248.

**Mahat, M. K., Illias, R. M., Rahman, R. A., Rashid, N. A. A., Mahmood, N. A. N., Hassan, O., Aziz, S. A. et Kamaruddin, K.**, 2004. Production of cyclodextrin

## Références bibliographiques

---

glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus sp.* TSI-1: Media optimization using experimental design. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 467-473.

**Martínez-Villaluenga, C., Friás, J., Vidal-valverde, C et Go´mez, R.,** 2005, Raffinose Family of Oligosaccharides from Lupin Seeds as Prebiotics: Application in Dairy Products *Journal of Food Protection.* 68 (3): 170–176

**Martínez-Villaluenga, C et Go´mez, R.,** 2007. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal.* 17, 116–122.

**Matijević, B., Božanić, R., Tratnik, L.,** 2009., The influence of lactulose on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reconstituted sweet whey. *Mljekarstvo.* 59 (1): 20-27.

**Mayo, B., Aleksandrak – Piekarczyk, T., , Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P et Bardowski, J.,** 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In Mozzi, F., Raya, R.R et Vignolo, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications.* Blackwell Publishing. P: 3-33.

**Meyer, A., Deiana, J et Bernard, L.,** 2004. Cours de microbiologie générale. Édité par : Doin, 2<sup>ème</sup> édition. P: 430.

**Mohamed, A.A et Rayas-duarte, P.,** 1995. Composition of *Lupinus albus*. *Cereal Chem.* 72(6):643-647.

**Monnet, C., Latrille, E., Béal, C et Corrieu, G.,** 2008 .Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In Corrieu, G et Luquet, F.N. *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.* TEC et DOC Lavoisier. Paris. P: 512-594.

**Monnet, V., Atlan, D., Beal, C., Champomier-Verges, M.C., Chapot-Chartier, M.P., Chouayekh, H., Cocaign-Bousquet, M., Deghorain, M., Gaudu, P., Gilbert., C, Guedon E., Guillouard, I., Goffin, P., Guzzo, J., Hols, P., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N.D., Lortal, S., Loubière, P., Maguin, E., Monnet, C., Rul F., Tourdot-Marechal, R., Yvon, M.,** 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In Corrieu, G et Luquet, F.N. *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.* TEC et DOC Lavoisier. Paris. P: 271-509.

**Nagarjun, P.A.,** 2015. Parametric optimization of lactic acid production and its scale up using free and immobilized cells of *Lactobacillus amylovorus* NRRL B- 4542. *Int. J. Pure App. Biosci.* 3 (5): 159-168.

## Références bibliographiques

---

- Naveena, B.J., Altaf,M., Bhadrappa, K., Madhavendra, S.S., et Reddy, G.,** 2005. Direct fermentation of starch to l (+)lactic acid in SSF by *Lactobacillus anylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM, *Process Biochem.* 40: 681– 690.
- Nigussie, Z.,** 2012. Contribution of White Lupin (*Lupinus albus* L.) for Food Security in North-Western Ethiopia: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences.* 11(5): 200-205.
- Novel, G.,** 1993. Les bactéries lactiques. In Leveau, J. Y, Bouix, M. *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel.* Edition Tec et Doc, Lavoisier. P : 170-331.
- O'Grady, B et Gibson, G. R.,** 2005. Microbiota of the Human Gut. In Tamime, A. *Probiotic Dairy Products.* Blackwell. P: 1-12.
- Otiento, D. O.,** 2011. Biology of Prokaryotic Probiotics. In: Liang Min-Tze. *Probiotics. Biology, Genetics and Health Aspects.* Edition Springer. P: 2-25.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S et Isolauri, E.,** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Ant Van Leeuw.* 82:279-289.
- Panesar, P.S., Kennedy, J, F., Knill, C, J et Kosseva, M.,** 2010. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian archives of biology and technology* .53(1): 219-226.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N et Bunko,K.,** 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry.* 105, 1-14.
- Papagora,C., Roukas,T et Kotzekidou, P.,** 2013. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology .*food and bioproducts processing* .91, 413–420.
- Parente, E et Hill,C.,** 1992. A Comparison of Factors Affecting the Production of Two Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria,” *Journal of Applied Bacteriology.* 73(4), 290-298.
- Partanen, L., Marttinen, N et Alatossava, T.,** 2001. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Systematic and Applied Microbiology.* 24, 500-506.

## Références bibliographiques

---

- Pescuma, M., Hébert., E.M., Mozzi., F., Fond de Valdez, G.,** 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*. 25, 442-451.
- Pilet, M. F., Magras, C., Federighi, M.,** 1998. Bactéries lactiques in Sutra, L., Federighi, M et Jouve, J. L. Manuel de bactériologie alimentaire.Polytechnica .P : 235-259.
- Plackett, R.L et Burman, J.P.,** 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305-325.
- Polak-Berecka, M., 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.
- Pot, B.,** 2008. The taxonomy of lactic acid. In Corrieu, G et Luquet, F.N. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec et Doc Lavoisier. Paris. P : 1-109.
- Pujari, V et Chandra, T. S.,** 2000. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV mutant of *Eremothecium ashbyii*. *Process Biochem*. 36: 31-37.
- Rao, J. L. U. M. et Satyanarayana, T.,** 2003. Statistical optimization of a high maltose forming, hyper thermostable and Ca<sup>2+</sup>-independent  $\alpha$ -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology. *J. Appl. Microbiol*. 95: 712-718.
- Rattanachaikunsopon, P et Phumkhachorn, P.,** 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their use in food production. *Annals of Biological Research*. 1 (4), 218-228.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y.J., Yun, J.S et Ryu, H.W.,** 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology* 99 : 2242–2249.
- Reuter, G.,** 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2: 55 -68.
- Rochat, T et Langella, P.,** 2009. Les probiotiques in : Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme et application industrielles. In Drider, D., Prevest, H .Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme et applications industrielles. *ECONOMICA*. P : 505-515.

## Références bibliographiques

---

- 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
- Rodríguez-Carrio, J., Fernández, A., Riera, F.A., Sáurez, A.,** 2014. Immunomodulatory activities of whey-lactoglobulintryptic-digested fractions. *International Dairy Journal.* 34, 65-73.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J et Mattila-Sandholm, T.,** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology.* 84 : 197– 215.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., Matto, J.,** 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal.* 13: 291-302.
- Salveti, E., Torriani, S et Felis, G. E.,** 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update *Probiotics & Antimicro. Prot.* 4: 217–226.
- Schillinger et Holzapfel.,** 2012. Culture media of lactic acid bacteria. In Corry, D., Curtis, G et Baird, R. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* 3<sup>ème</sup> edition. RSC. P: 174-186.
- Schneider, A., Huyghe, C., Maleplate, T., Labalette, F., Corinne Peyronnet, C et Carrouée, B.,** 2015. Rôle des légumineuses dans l’agriculture française in Schneider, A., Huyghe, C. *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* Éditions Quæ. P 11-77.
- Sgarbieri, V.C et Galeazzi,M.A.M.,** 1978. Some Physicochemical and Nutritional Properties of a Sweet Lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*) Protein. *J. Agric. Food Chem.*26 (6): 1438–1442.
- Siti Balkhis, I., Nor’Aini, A.R., Rosfarizan, M et Raha, A.R.,** 2010. Effects of agitation speed, temperature, carbon and nitrogen sources on the growth of recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 carrying domain 1 of aerolysin gene. *African Journal of Biotechnology.* 9 (33): 5392-5398.
- Soares de Castro, R.J.,Sato, H.H.,** 2014. Functional properties and growth promotion of bifidobacteria and lactic acid bacteri astrains by protein hydrolysates using a statistical mixture design. *Food Bioscience.* 7, 19 – 30.

## Références bibliographiques

---

- Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W.P., Vogel, R.F.,** 1995. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough: I. *Lactobacillus sanfransisco*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 201, 91–96.
- Sweetingham, M et Kingwell, R.,** 2008. lupins – reflections and future possibilities in Palta, J.A et Berger, J.B. (eds). 2008 ‘Lupins for Health and Wealth’ Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN 0-86476-153-8.
- Święcicki, W., Kroc, M et Kamel, K.A.,** 2015 in Lupin , De Ron, A.M. Grain Legumes, Handbook of Plant Breeding, Springer Science+Business Media New York. P 179-218.
- Taleghani, H.G., Ghasem D., Najafpour, G.D et Ghoreysh, A.S.,** 2016. A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. Polish Journal of Chemical Technology. 18 (1): 58- 63.
- Tango, M.S.A et Ghaly, A.E.,** 1999. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. Biomass Bioeng. 17: 221–238.
- Trugo, L. C., Donangelo, C. M., Duarte, Y. A et Tavares, C. L.,** 1993. Phytic acid and selected mineral composition of seed from wild species and cultivated varieties of lupin. Food Chem. 47:391-394.
- Trujillo, M.E., 1 Willems ,A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P.F., Martí'nez-Molina, E et Vela'zquez, E.,** 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and environmental microbiology. 71 (3): 1318–1327.
- Uzun, B., Arslan, C., Karhan, M et C. Toker.,** 2007. Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus L.*) in comparison to sesame (*Sesamum indicum L.*). Food Chemistry 102 : 45–49.
- Vázquez, J.A., Docal, S.F., Prieto, M.A., González, M.A., Murado, M.A.,** 2008. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-salige of fishing by-products. Bioresource Technology. 99: 6246-6257.
- Vázquez, J.A., Murado, M.A.,** 2008. Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures Application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions. Biochemical Engineering Journal. 39, 176-287.

## Références bibliographiques

---

- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M J., Esteban, E., Penalosa, J.M et Carpena, R.O.,** 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of cd and as polluted acid soil.
- Vignola, C. L.,** 2002. Sciences et technologie du lait transformation du lait. Plytechnique. P: 306. Water, Air, and Soil Pollution.177: 349–365.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J.,** 2008. Prescott, Harley, and Klein's microbiology. 7ème édition. P: 110-111.
- Williams, W et Mcgibbon, R.,** 1980. Environmental effect on seed oil percentage and fatty acid composition in white lupin. J.Agric. Sci. 95: 597-602.
- Wong, N. P., Lacroix, D.E., Mc dounough, F. E.,** 1978. Minerals in whey and whey fractions. J Dairy Sci. 61: 1700-1703.
- Xu, H., Sun,L., Zhao,D., Zhang,B., Shi,Y., Wu,Y.,** 2008. Production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* As-3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. Journal of the Science of Food and Agriculture. 88 (3): 529–535.
- Ziadi, M., Rezouga, F., Bouallagui, H., Baâti, L., Ben Othman, N., Thonart, P et Hamdi, M.,** 2010. Kinetic Study of *Lactococcus lactis* strains (SLT6 and SLT10) Growth on Papain- Hydrolysed Whey. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26 (12): 2223-2230.

## Résumé

L'objectif de ce travail était la mise au point et l'optimisation d'un milieu de culture à base de lupin et de lactosérum pour la croissance de cinq lactobacilles par deux modèles statistiques (Plackett-Burman et le plan composite central de Box et Wilson). Dans une première partie, le plan d'expériences de Plackett et Burman a permis de sélectionner le tween 80, le pH, la vitesse d'agitation, le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{MgSO}_4$  et le taux d'inoculum comme facteurs significatifs pour la croissance des lactobacilles. Dans une seconde partie, le plan composite central de Box et Wilson qui a été utilisé pour déterminer le niveau optimal des facteurs sélectionnés a permis d'établir la composition finale des milieux pour chaque souche comme suit: 1,56 ml / l de tween inoculé à un taux de 5,25% pour *Lactobacillus fermentum*, 0,65g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,67ml/l de tween 80 et une vitesse d'agitation de 147,47 tpm pour *Lactobacillus brevis*, 2,34 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,65 ml/l de tween 80 et une agitation de 147,47 tpm pour *Lactobacillus plantarum* et 0,65 ml/L de tween avec un pH ajusté à 6,62 et une vitesse d'agitation de 180,68 tpm pour *Lactobacillus rhamnosus*. Sous ces conditions optimales, la croissance de *Lactobacillus fermentum* sur le milieu à base de lactosérum et de lupin était 72.54% supérieure à celle sur MRS avec des valeurs de l'absorbance à  $\text{DO}_{600}$  de 7,04 sur le milieu formulé et de 4,08 sur milieu MRS. Par ailleurs, Le nombre de cellules viables de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* qui correspond à 9,30 ; 9,35 et 9,41 log UFC/ml respectivement sur les milieux formulés, était légèrement supérieur à celui observé sur MRS 9,16 ; 8,90 et 9,00 log UFC/ml respectivement. La cinétique de croissance de la souche probiotique de *Lactobacillus farciminis* sur l'hydrolysate de lactosérum et de lupin montre que le milieu permet une bonne croissance de la souche en comparaison avec le MRS, cependant, l'addition du lactulose au milieu n'a pas amélioré la croissance de la souche. Ainsi, l'hydrolysate de lactosérum et de lupin constitue une bonne source alternative d'azote qui mène à une meilleure croissance des lactobacilles, peut être utilisé pour la production de biomasse à grande échelle.

Mots clé : Bactéries lactiques, croissance, lupin, lactosérum, optimisation.

## Abstract

The aim of this work was the formulation and the optimization of a whey and lupin based medium of the growth of five strains of lactobacilli using two statistical models (Plackett-Burman design and central composite design of the Box and Wilson). In the first part, the use of Plackett and Burman design was allowed the screening of: tween 80, pH, agitation, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and the inoculum size as significant factors for the growth of lactobacilli. In the second part, the central composite design Box and Wilson that was used to determine the optimal level of selected factors helped to determine the final composition of the media for each strain as follows: 1.56 ml / l of tween inoculated at a rate of 5.25% for *Lactobacillus fermentum*, 0.65 g / l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0,67 ml / l of tween 80 and a agitation of 147.47 rpm for *Lactobacillus brevis*, 2.34 g / l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.65 ml / l of tween 80 and and a agitation of 147.47 rpm for *Lactobacillus plantarum* and 0.65 ml / L of tween 80 with a pH adjusted to 6.62 and a agitation of 180, 68 rpm for *Lactobacillus rhamnosus*. Under these optimum conditions, the growth of *Lactobacillus fermentum* on whey and lupin based medium was 72.54% higher than that on MRS with values of absorbance at OD<sub>600</sub> of 7.04 on the formulated medium and 4.08 on MRS. Furthermore, the number of viable cells of *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* which corresponds to 9.30; 9, 35 and 9, 41 log CFU/ml respectively on the formulated media, was slightly higher than that observed on MRS 9.16; 8.90 and 9.00 log CFU/ml respectively. The growth kinetics of the probiotic strain of *Lactobacillus farciminis* on whey and lupin hydrolyzate shows that the medium provides good growth of the strain compared to the MRS, however, the addition of lactulose to the medium did not improve the growth of the strain. Thus, whey and lupin hydrolyzate is a good alternative source of nitrogen that leads to better lactobacillus growth can be used for large-scale biomass production.

Key words: Lactic acid bacteria, growth, lupin, whey, optimization

## المخلص

تهدف هذه الدراسة الى صياغة و تعديل وسط نمو جيد لخمس سلالات من بكتيريا حمض اللبن يتكون من الترمس ومصل اللبن كمركيبن اساسيين بواسطة استخدام طريقتين احصائيتين (Plackett-Burman, Box-Wilson). في الجزء الاول من الدراسة تم اختيار توين 80 ، درجة الحموضة ، سرعة الاضطراب، فوسفات الصوديوم ، سولفات المغنزيوم ومعدل الحقن كعناصر اساسية لها تاثير ايجابي على نمو السلالات. في الجزء الثاني، سمح مخطط Box-Wilson الذي تم استخدامه بتحديد المستوى الأمثل للعناصر التي تم اختيارها عن طريق المخطط الاول وتم تحديد الصيغة النهائية من اوساط النمو لكل سلالة النحو التالي: 1.56 مل / لتر من توين تفتح بمعدل 5.25% ل *Lactobacillus fermentum*، 0.65 جم / لتر فوسفات الصوديوم و 0.67 مل / لتر توين 80 و سرعة الاضطراب 147.47 دورة في الدقيقة ل *Lactobacillus brevis*، 2.34 جم / لتر فوسفات الصوديوم، 0.65 مل / لتر من توين 80 و سرعة الاضطراب 147.47 دورة في الدقيقة ل *Lactobacillus plantarum* و 0.65 مل / لتر من توين مع تعديل درجة الحموضة إلى 6.62، سرعة الاضطراب. 68. 180 دورة في الدقيقة ل *Lactobacillus rhamnosus*. في ظل تلك الظروف المثلى ، كان نمو *Lactobacillus fermentum* في الوسط المكون من الترمس و مصل اللبن افضل ب 72.54% من الوسط MRS مع قيمة امتصاص في OD<sub>600</sub> تعادل 7.04 مقارنة مع قيمة 4.08 مسجلة في الوسط MRS علاوة على ذلك، فإن عدد الخلايا الحية ل *Lactobacillus brevis*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* المسجل في الوسط المشكل 9.30، 9.41، و 9.35 على التوالي كان اكبر نسبيا مقارنة مع العدد المسجل في الوسط MRS المقدر ب 9.16، 8.90 و 9.00 على التوالي. دراسة حركية النمو لسلالة *Lactobacillus farciminis* في الوسط المكون من الترمس و مصل اللبن تبين انه يوفر جميع العناصر الضرورية للسلالة بالمقارنة مع MRS، غير ان إضافة الاكتيلوز إلى الوسط لم يحسن نمو السلالة. وعلى هكذا، فان مكونات مصل اللبن والترمس تعتبر بديل جيد لنيتروجين MRS.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا حمض اللبن, نمو, ترمس, مصل اللبن, تحسين.



## **Annexes**

# Annexes

---

## Annexe 1

### Composition du milieu MRS (Pronadisa, Conda S.A., Spain)

Peptone 10,0 (g/l)

Extrait de viande 8,0 (g/l)

Extrait de levure 4,0 (g/l)

Glucose 20,0 (g/l)

Acétate de sodium trihydraté 5,0 (g/l)

Citrate d'ammonium 2,0 (g/l)

Tween 80 1,0 (ml/l)

Hydrogénophosphate de potassium 2,0 (g/l)

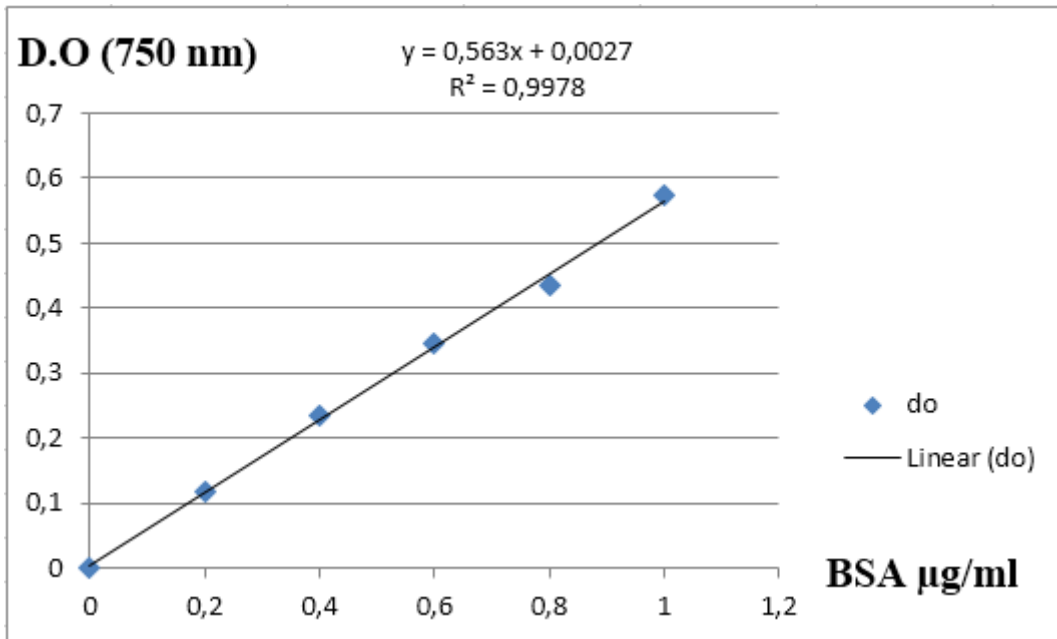
Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 (g/l)

Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 (g/l)

Agar 10,0 (g/l)

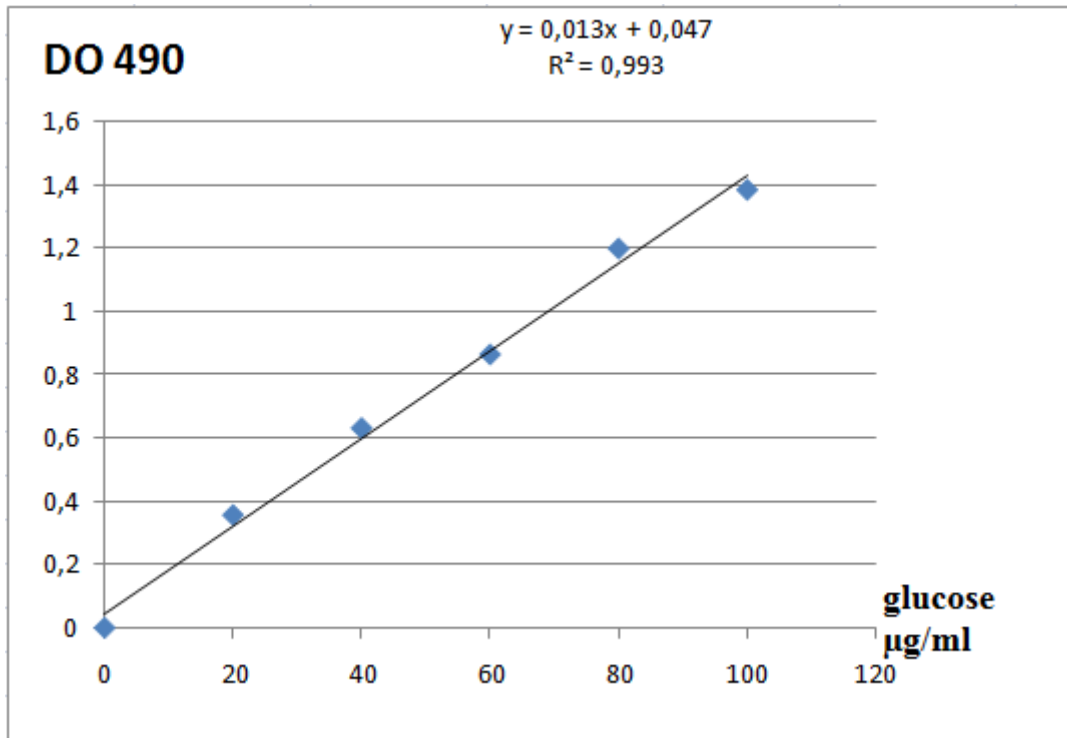
pH = 6,2

Annexe 2



Courbe d'étalonnage des protéines.

Annexe 3



Courbe d'étalonnage de glucose

## Annexes

### Annexe 4

#### Préparation des solutions pour le dosage de lactose selon la méthode de Bertrand

N°	Solution	Composition
1	Solution aqueuse d'hexacyanoferrate (II) de potassium	(K <sub>4</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> · 3 H <sub>2</sub> O) 15 g + Eau distillée 100 mL
2	Solution aqueuse d'acétate de zinc	(Zn (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O) 30 g + Eau distillée 100 mL
3	Solution cuivrique	(CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O) 40 g (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ρ 20 = 1,83 g/mL) 2 mL eau distillée 1000 mL
4	Solution tartro-alkaline	(Na K (H <sub>4</sub> C <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ), 4 H <sub>2</sub> O) 200 g -(NaOH) 150 g  eau distillée 1000 mL
5	Solution ferrique	(Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ) 50 g -(H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ρ 20 = 1,83 g/mL) 200 g -eau distillée 1000 mL Avant emploi, oxyder exactement, s'il y a lieu, par addition d'une solution de permanganate de potassium 0,1 N, la petite quantité de sel ferreux éventuellement présente dans cette solution de sel ferrique.
6	Solution de kmg	Solution titrée de permanganate de potassium 0,1 N. 1 mL de cette solution correspond à 6,35 mg de cuivre.

## Annexes

### Annexe 5

**Tableau de correspondance entre la quantité de lactose hydraté, exprimée en milligrammes, et le volume de la solution de permanganate de potassium 0,1 N.**

KMnO <sub>4</sub> 0,1N	Lactose hydraté	KMnO <sub>4</sub> 0,1N	Lactose hydraté	KMnO <sub>4</sub> 0,1N	Lactose hydraté
5,0	23,8	8,9	43,0	12,8	63,1
5,1	24,1	9,0	43,5	12,9	63,6
5,2	24,6	9,1	44,0	13,0	64,1
5,3	25,1	9,2	44,5	13,1	64,7
5,4	25,6	9,3	45,0	13,2	65,2
5,5	26,1	9,4	45,5	13,3	65,7
5,6	26,6	9,5	46,0	13,4	66,2
5,7	27,1	9,6	46,5	13,5	66,8
5,8	27,6	9,7	47,1	13,6	67,3
5,9	28,0	9,8	47,6	13,7	67,8
6,0	28,5	9,9	48,1	13,8	68,4
6,1	29,0	10,0	48,6	13,9	68,9
6,2	29,5	10,1	49,1	14,0	69,4
6,3	30,0	10,2	49,6	14,1	69,9
6,4	30,5	10,3	50,1	14,2	70,5
6,5	31,0	10,4	50,6	14,3	71,0
6,6	31,5	10,5	51,2	14,4	71,5
6,7	32,0	10,6	51,7	14,5	72,0
6,8	32,5	10,7	52,2	14,6	72,6
6,9	33,0	10,8	52,7	14,7	73,1
7,0	33,5	10,9	53,2	14,8	73,6
7,1	34,0	11,0	53,7	14,9	74,1
7,2	34,5	11,1	54,2	15,0	74,7
7,3	35,0	11,2		54,8	
7,4	35,5	11,3		55,3	
7,5	36,0	11,4		55,8	
7,6	36,5	11,5		56,3	
7,7	37,0	11,6		56,8	
7,8	37,5	11,7		57,4	
7,9	38,0	11,8		57,9	
8,0	38,5	11,9		58,4	
8,1	39,0	12,0		58,9	
8,2	39,5	12,1		59,9	
8,3	40,0	12,2		60,0	
8,4	40,5	12,3		60,5	
8,5	41,0	12,4		61,0	
8,6	41,5	12,5		61,5	
8,7	42,0	12,6		62,1	
8,8	42,5	12,7		62,6	



**Publication**

## Optimization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 Growth on Whey and Lupin Based Medium Using Response Surface Methodology

<sup>1</sup>Saida Hanoune, <sup>1,2</sup>Baida Djeghri-Hocine, <sup>1</sup>Zohra Kassas, <sup>1</sup>Zineb Derradji, <sup>1</sup>Aicha Boudour and <sup>1</sup>Messaouda Boukhemis

<sup>1</sup>Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée, Université Badji-Mokhtar BP12, 23000 Annaba, Algérie

<sup>2</sup>Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de L'aménagement du Littoral, Alger, Algérie

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the potential use of whey components and lupin proteins as cheap nutrients in the formulation of optimum medium for lactic acid bacteria growth, for this purpose a Plackett and Burman design was used to screen variables (medium components and physical parameters) that have significant effects on the growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 in whey and lupin based medium. Statistical analysis of the results allowed selecting two factors having a significant positive effect on the bacterial growth (tween 80 and inoculum size). Central composite design was used to determine the optimum level of the selected factor. Under these optimized conditions, the composition of WLM (Whey and Lupin Medium) was the basic medium of whey and lupin supplemented with 1.56 mL/L of tween and inoculated at a rate of 5.25% with a maximum OD<sub>600</sub> value of 6.88. Based on the comparison of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth on the formulated medium with that observed on MRS (standard laboratory medium), the growth of the strain in WLM is much higher than that observed in MRS medium with a maximum OD<sub>600</sub> values of 7.04 on LWM and 4.08 on MRS medium, respectively and *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth in the new medium was 72.54% higher than that on MRS. Thus, whey and lupin hydrolysates are good alternative sources of nitrogen that lead to a better growth of the strain and can be used for large-scale production.

**Keywords:** Growth medium, *Lactobacillus fermentum* DSM 20049, lupin, optimization, whey

### INTRODUCTION

Lactic Acid Bacteria (LAB) are industrially important organisms recognized for their fermentative ability to contribute in improving flavor, texture and safety of perishable raw materials such as milk, meat and vegetables (Georgiva *et al.*, 2009; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

They are known also by having various beneficial functions such as anti-tumor activity, reduction of serum cholesterol, alleviation of lactose intolerance, stimulation of the immune system, enhancement of resistant against pathogens and prevention of traveler's diarrhea (Lee and Lee, 2008).

However, their growth requires complex and rich media, containing complex nitrogen sources (peptides), carbon sources, vitamins and minerals that should be supplied at optimal concentrations (Djeghri-Hocine *et al.*, 2010). Commercial media like MRS, TGE or ATP solve the problem of protein sources, through products such as bactopectone, tryptone, meat or yeast extracts (sometimes both of them) in their formulation. This latter reaches high costs (Vázquez and Murado,

2008) and consequently reduces the profitability of the large-scale culture of LAB, whether it is for producing probiotic biomass or bacteriocins (Vázquez *et al.*, 2008). Therefore, it is of the primary interest to reduce the cost of growth media by using low-cost components (JuárezTomás *et al.*, 2010) and wastes.

Whey is a by-product of the cheese industry often disposed as a waste in the paste and causes high environmental contamination since it affects the physical and chemical structure of soil, resulting in a decrease in crop yield and when released into water bodies, reduces aquatic life by depleting the dissolved oxygen (Panesar *et al.*, 2007; Pescuma *et al.*, 2008; Rodríguez-Carrio *et al.*, 2014).

Due to its composition, it is a good substrate to be used in various biotechnological processes. One of the most attractive ways of whey utilization is its fermentation by LAB. However, LAB have significantly less activity in whey in comparison with milk, which may be explained by the significantly low amounts of nutrients composing whey, which are necessary for the growth of LAB that require highly nutritionally rich medium (Bulatović *et al.*, 2014).

**Corresponding Author:** Saida Hanoune, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée, Université Badji-Mokhtar BP12, 23000 Annaba, Algérie, Tel.: +213 550 88 91 97; Fax: +213 38 87 26 53

Lupin is an economically and agriculturally valuable plant that grows in different soils and climates. It is cultivated as a ruminant feed, as a green manure contributing to improve soil structure and has a strong capacity to fix nitrogen. It is also used for human nutrition due to its high protein and oil contents (Dervas *et al.*, 1999; Erbas *et al.*, 2005; Gulewicz *et al.*, 2008). The aims of this study are the following:

- To evaluate the potential use of whey components and lupin proteins as cheaper nutrients in the formulation of optimum medium for the LAB growth and lactic acid production to reduce media cost.
- To optimize the physical and nutritional parameters for the growth of a *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 strain using Plackett and Burman Design (PBD) and Central Composite Design (CCD).
- To compare the growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 on medium formulated with their observed on MRS (standard laboratory medium).

## MATERIALS AND METHODS

**Microorganism and culture conditions:** *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 was used in this study: strain of the collection was provided kindly as freeze dried from DSMZ laboratory by Pr. Amrane. A. The strain was maintained at 4°C and sub-cultured monthly on MRS medium agar slants.

**Inoculum preparation:** The inoculum was prepared by transferring one colony into 10 mL of MRS broth (Pronadisa, Conda S.A., Spain) and incubated for 16 h at 37°C. The culture adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.60 was used to inoculate growth media.

**Basic medium of lupin and whey preparation:**

**Lupin Whey Protein Extracts (LWPE) preparation:** Sixty gram of lupin flour was added into 1000 mL of whey powder reconstituted at 6% (w/v) corresponding to 34 g/L of lactose before use. The resulting slurry was magnetically stirred for 20 min after adjusting the initial pH to 9 in order to solubilize lupin proteins, constituted essentially by globulins which are insoluble in water at the Isoelectric Point (pI). Most of lupin proteins (85-95%) are soluble at pH 9.0 (Chango *et al.*, 1995).

The mixture was centrifuged at 4000 rpm for 20 min at room temperature and the resulting supernatant rich in lupin proteins and lactose was adjusted to pH 6.0 for further enzymatic hydrolysis.

**Enzymatic hydrolysis:** The supernatant hydrolysis was carried out at 55°C with horizontal shaking at 100 rpm for 24 h after the addition of 50 µg of papain into the resulting supernatant. The mixture was heated at 100°C for 20 min to make the enzyme inactivated. After that, the mixture was centrifuged at 4000 rpm for 20 min and the resulting supernatant has been used as a basic medium of lupin and whey.

Table 1: Levels of variable medium ingredients and physical parameters used in PBD

Factors	Symbol	High level (+1)	Low level (-1)
Yeast extract (g/L)	X <sub>1</sub>	5.00	0.0
Meat extract (g/L)	X <sub>2</sub>	4.00	0.0
Sodium acetate (g/L)	X <sub>3</sub>	5.00	0.0
Tri-ammonium citrate (g/L)	X <sub>4</sub>	2.00	0.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	X <sub>5</sub>	0.20	0.0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (g/L)	X <sub>6</sub>	0.05	0.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (g/L)	X <sub>7</sub>	1.00	0.1
Tween 80 (g/L)	X <sub>8</sub>	1.00	0.0
Agitation (rpm)	X <sub>9</sub>	120	0.0
Inoculum size (%)	X <sub>10</sub>	5.00	2.0
pH	X <sub>11</sub>	6.50	5.5

**Screening of the nutrients and physical parameters using plackett-burman design and statistical analysis of data:** Plackett-Burman Design (PBD) was used to screen variables (medium components and physical parameters) that have significant effects on *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth (Plackett and Burman, 1946). A set of 12 experiments (k+1) was carried out for 11 factors (k = 11), each variable was represented at two levels: high (+1) and low concentration (-1).

**Among the factors:** Yeast extract (X<sub>1</sub>), meat extract (X<sub>2</sub>), sodium acetate (X<sub>3</sub>), tri-ammonium citrate (X<sub>4</sub>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>5</sub>), MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (X<sub>6</sub>), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (X<sub>7</sub>), tween 80 (X<sub>8</sub>), Agitation (X<sub>9</sub>), inoculum size (X<sub>10</sub>) and pH (X<sub>11</sub>) were used. All nutrients were added to basic medium of lupin and whey after sterilization at 121°C for 15 min with 2 concentrations (Table 1).

MINITAB 16 trial version was used for the regression analysis of the experimental data obtained (Table 2).

Statistical analysis of the response was performed and represented in Table 3.

The significance of each variable was determined via Student's t-test and the level of significance was given as p-value ≤ 0.3.

**Central Composite Designs (CCD):** The Central Composite Design (CCD) was used as a second experiment to determine the optimum level and the interaction between the significant variables with a positive effect on the growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049.

Based on the results of PBD, inoculum size (X<sub>1</sub>) and tween 80 (X<sub>2</sub>) were selected for further optimization using CCD.

For this purpose, a 2<sup>2</sup> full factorial design was carried out with five replicates at the center points leading to a matrix of CCD design consisted of 13 experimental runs.

Each factor was studied at five experimental levels (-1, 41, -1, 0, +1 and 1, 41) (Table 4 and 5).

Table 2: Proximate composition of lupin whey hydrolysate

	Protein (%)	Total sugar (%)	Lactose (%)	Ash (%)
Powder whey	21.10	/	56.66	/
Lupin	33.56	/	/	/
Lupin Whey Hydrolysate (LWH)	53.42	31.65	/	4

Assays were carried out in triplicate

Table 3: Plackett-Burman design of variables (in coded levels) with optical density values as response

Run order	Factors											OD values
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	7.36
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	6.98
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	7.26
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1.44
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.78
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	1.06
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	7.50
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	1.12
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	1.86
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	7.60
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	1.12
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6.08

+1: Higher level; -1: Lower level

Table 4: Statistical analysis of Plackett-Burman design results

Term	Coef.	S.E. coef.	t-value	p-value
Constant	4.2633	0.1244	34.28	0.000
Yeast extract	0.1067	0.1244	0.86	0.454
Meat extract	0.1300	0.1244	1.05	0.373
Sodium acetate	0.4302	0.8883	0.48	0.641
Tri-ammonium citrate	0.0433	0.1244	0.35	0.751
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0.1602	0.8883	-0.18	0.861
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-0.0033	0.1244	-0.03	0.980
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	-1.5612	0.9140	-1.71	0.126
Tween 80	0.1867	0.1244	1.50	0.230
Agitation	-2.8667	0.1244	-23.05	0.000
Inoculum size	0.2633	0.1244	2.12	0.125
pH	-0.0333	0.1244	-0.27	0.806

R<sup>2</sup> = 99.40%; R<sup>2</sup> (adj) = 98.00%; S.E.: Standard error

Table 5: Central composite design results

Run order	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	OD (600 nm)
1	6.0000	1.0000	5.92
2	6.0000	2.0000	5.92
3	4.5000	1.5000	6.24
4	4.5000	1.5000	6.16
5	4.5000	2.2071	5.60
6	3.0000	2.0000	4.72
7	2.3786	1.5000	4.40
8	4.5000	0.7928	5.04
9	4.5000	1.5000	6.20
10	3.0000	1.0000	5.04
11	6.6213	1.5000	5.84
12	4.5000	1.5000	6.32
13	4.5000	1.5000	6.30

MINITAB 16 trial version was used for multiple regression analysis and Design Expert version 9.0.3.1 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, MN, USA) was used for the generation of surface plot and 3D-contour plots.

#### Analytical methods:

**Measurement of growth:** Cell growth measurement was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 600 nm after appropriate dilution to keep the absorbance values of fermented samples previously incubated at 37°C for 24 h below 0.6 and the resulting

absorbance value was multiplied by the corresponding dilution factor to achieve the final OD<sub>600</sub> value.

#### Growth kinetics of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049:

The growth curves were monitored by measuring the optical density OD<sub>600</sub> every 1 h until it reaches the stationary phase. Both of MRS and WLP media were inoculated at a rate of 5.25% and incubated at 37°C for 24 h in the same conditions.

**Determination of medium composition:** Proteins were determined according to the method of Lowry *et al.* (1951). The amount of total sugars was measured by the phenol-sulfuric reaction (Dubois *et al.*, 1956), with glucose as standard.

Dry matter % was measured after drying samples at 105°C to a constant weight and ash percentage was calculated by reweighting samples after subsequent 5 h incubation at 550°C.

## RESULTS

**Screening of significant variables using PBD:** The examination of the data listed in Table 3 has shown a

large variation in the growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 in the 12 trials from 1.06 to 7, which proves the importance of using the PBD and CCD to optimize the conditions (nutrients and physical parameters) required by the strain to improve its growth.

**Analysis of the regression coefficients and the t-values of 11 factors:** The obtained data showed the significance of 4 factors: Agitation, inoculum size, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O and tween 80 with p-values corresponding to 0.00, 0.125, 0.126 and 0.23, respectively (Table 4).

Agitation was determined to be the most significant, but with a negative coefficient. In the six trials without agitation, the bacterial population reached only an OD<sub>600nm</sub> between (1.06-1.44) units whereas (6.08-7.6) units were detected in the 6 other trials with agitation. Therefore, the agitation showed stronger inhibitor effect for *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth.

This result is consistent with previous searches showing that the agitation may be unfavorable for LAB growth; this is especially the case of *Streptococcus thermophilus* (Louaileche *et al.*, 1993).

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O was also exhibited to have a negative effect as the whey contains a concentration of sodium (Wong *et al.*, 1978) that can exceed the requirement of the strain.

The inoculum size was found to be significant with a positive effect. Thus, it was selected for further optimization using CCD to determine the optimum level of initial active biomass to obtain a better growth of the organism.

Tween 80 was also found to be significant but with a positive effect since it is composed of a mixture of oleic esters. It is a source of fatty acids essential for the growth of these bacteria and it was also selected for further optimization.

All other seven factors (yeast extract, meat extract, sodium acetate, tri-ammonium citrate, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O and pH) were found to be insignificant; therefore they will be excluded in further experiments.

**Central Composite Design (CCD):** As expected, based on the results of PBD, inoculum size (X<sub>1</sub>) and tween 80 (X<sub>2</sub>) were selected to determine the optimum level of each factor for a bacterial growth improvement. Inoculum size was used at a range of 2.37-6.62% and tween 80 at 0.79-2.2 mL/L.

The significance of each coefficient was determined by Student's t-test and p-values.

The design matrix of tested variables and the experimental results are shown in Table 5 and 6.

The coefficient of determination (R<sup>2</sup>) was calculated as 0.9537 indicating good agreement

Table 6: Analysis of variance of the central composite design

Term	Coef.	S.E. coef.	t	p
Constant	-3.1626	1.24148	-2.547	0.038
X <sub>1</sub>	2.2510	0.33742	6.671	0.000
X <sub>2</sub>	4.6420	1.01226	4.586	0.003
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	-0.2298	0.03104	-7.403	0.000
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	-1.6680	0.27935	-5.971	0.001
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	0.1228	0.12280	0.869	0.414

R<sup>2</sup> = 95.37%; R<sup>2</sup> (adj) = 92.07%; S.E.: Standard error

between experimental observation and predicted values (Xu *et al.*, 2008) and thus, the model can explain 95.37% of the variability in the response. Only 4.63% of the total variation cannot be explained by the model.

The value of the adjusted determination coefficient (R<sup>2</sup><sub>adj</sub> = 0.9207) was high enough to indicate the significance of the model (Papagora *et al.*, 2013).

Both factors (inoculum size and tween 80) were found to be significant with a positive coefficient with p-values of 0.000 and 0.003 respectively. However, their interaction was insignificant.

The 3D plot and their respective 2D contour (Fig. 1) provide a visual interpretation for the interaction between the two factors selected and thus allow determining the optimum levels of each variable for maximum growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049. It is clear from its well form (convex form) that ranges of levels were well chosen.

The examination of the contour and three dimensional plots showed an increase of the growth as the inoculum size increased up to 5.25% and the tween 80 reached a concentration of 1.56 mL/L.

A maximum growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 (OD<sub>600</sub> = 6.32) can be obtained by combining the optimum levels of inoculum size and tween 80 given as 5.25% and 1.56 mL/L, respectively. A decrease of the growth was observed when the levels exceed these given optimum ones.

**Validation of the model:** Validation of the model was carried out in 180 mL flask containing 30 mL of medium composed of basic medium of whey and lupin supplemented with 1.56 mL/L of tween inoculated at a rate of 5.25% and incubated at 37° for 24 h. Under these optimized conditions, the predicted response for bacterial growth was 6.37 (data not shown) and the mean of the observed growth was 6.88. The good agreement between the predicted and the experimental values confirmed the validity of the model and their high degree of similarity indicated that the response surface methodology was a powerful optimization tool.

**Growth kinetics of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049:** In order to compare the bacterial growth in the elaborated medium with that in MRS, two curves were drawn with a vertical axis representing OD<sub>600</sub> values and an horizontal axis representing the elapsed time in hours (Fig. 2).

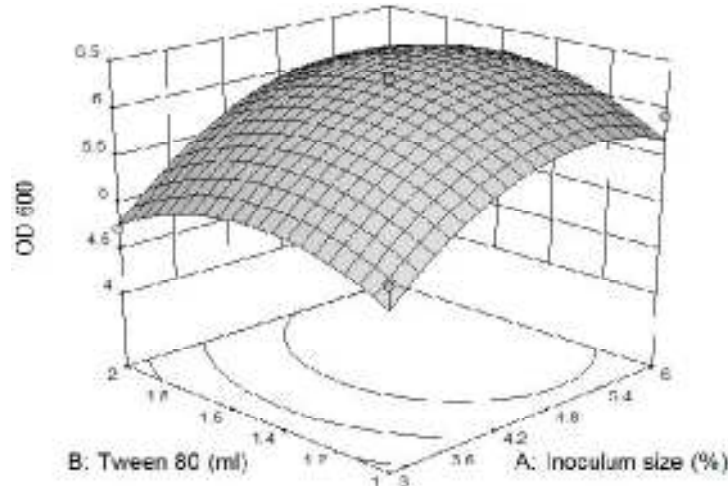


Fig. 1: Three-dimensional response surface plots for *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth showing the interactive effects of tween 80 and inoculum size

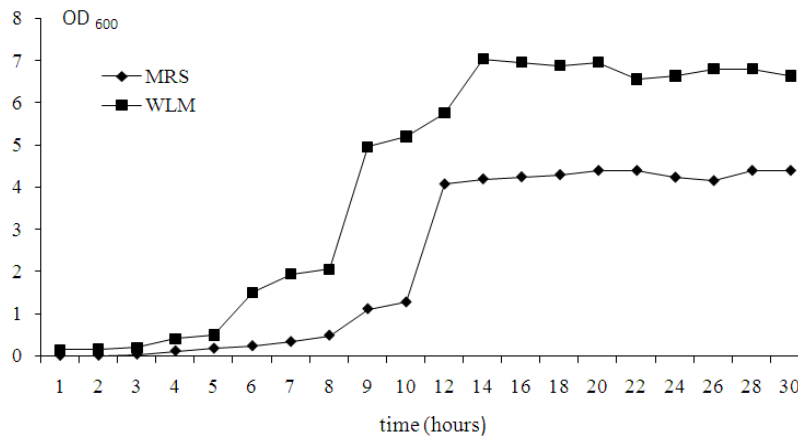


Fig. 2: Growth curves of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 on WLM and MRS medium

It has been noted that the bacterial growth follows a classic pattern of a batch culture. The growth of the strain on WLM is generally much higher than that observed on MRS medium, while the exponential phase was achieved after 5 h on WLM and 8 h on MRS medium and the maximum OD<sub>600</sub> values was 7.04 on WLM and 4.08 on MRS medium.

*Lb. fermentum* DSM 20049 growth on LWM medium was 72.54% higher than that on MRS.

### DISCUSSION

Nutritional requirements of LAB are fastidious: Culture media have to be supplemented with various peptide sources and growth factors. Among a variety of these nitrogen sources, yeast extract is the best one due to its high content of nitrogen compounds, abundant purine, pyrimidine bases and vitamins. It can contribute not only to high biomass, but also to high level lactic acid metabolism. However, the cost of yeast extract accounts for about 38% of the total lactic acid production cost and its high cost greatly impairs the

economic efficiency of lactic acid fermentation. Consequently, it is important to find cheap nitrogen source alternatives (Amrane, 2000; Liu *et al.*, 2010).

For this purpose, several low-cost alternative nitrogen sources have been tested to partially or totally replace yeast extract in order to stimulate the growth of probiotic and lactic acid bacteria species and to improve the amount of the produced lactic acid.

Among the previous works that dealt with this subject, Hujanen and Linko (1996) used corn steep liquor, malt sprout extract and casein hydrolysates to replace the costly yeast extract. Amrane (2000) evaluated the lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation.

Kwon *et al.* (2000) used soybean supplemented with vitamins for a complete replacement of yeast extract as for Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. While Djeghri-Hocine *et al.* (2006) used the horse bean extract for the supplementation of lactic acid bacteria culture media. Horn *et al.* (2007) studied the evaluation of different cod viscera fractions as a medium for lactic acid bacteria growth.

Djehri-Hocine *et al.* (2007a) studied the Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea-and chickpea-based media and the evaluation of delipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture (Djehri-Hocine *et al.*, 2007b).

Soares de Castro and Sato (2014) evaluated Soy protein isolate, bovine whey protein and egg white protein hydrolysates to promote the growth of bifidobacteria and lactic acid bacteria strains.

In this study, the use of whey and lupin hydrolysates showed a good alternative source of nitrogen leading to a well growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049. The whey, rich in protein and lactose, constitutes an excellent source of Carbone and the lupin, composed by 33.56% of proteins provides, after hydrolysis, the amino acid and short peptides required for the growth of the strain (Table 2). Moreover, it contains sugars of the Raffinose Family and Oligosaccharides (RFOs) with prebiotic importance that can improve the growth of some lactic acid bacteria strains (Erbas *et al.*, 2005; Martínez-Villaluenga and Gómez, 2007).

The use of CCD allowed elaborating the final composition medium with an inoculation rate of 5.25% and 1.56 mL/L of tween 80. This result is in agreement with the works of Dong *et al.* (2014) who showed that the tween 80 had a very significant beneficial effect on the cell growth and the cell concentration was approximately  $1.79 \cdot 10^9$  cfu/mL. Tween 80, which is a water soluble derivative of oleic acid (cis-9-octadecenoic acid), can stimulate the growth of many LAB. Most LAB grown in medium containing Tween 80 can incorporate oleic acid into their membranes and then transform it into cyclopropane fatty acids. Cyclopropane fatty acids can act like polyunsaturated fatty acids to increase the fluidity of membrane and protect LAB from bad environmental effects such as deleterious effects of oxygen, entering stationary growth phase and low pH caused by lactic acid accumulation. Consequently, Tween 80, which can also replace the biotin requirement of some strains, is regarded as a growth-stimulating factor for LAB (Hassinen *et al.*, 1951; Partanen *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2014).

## CONCLUSION

This study suggested that the whey and lupin hydrolysates showed a good alternative source of nitrogen leading to a well growth of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049.

The supplementation of the basic medium of whey and lupin supplemented with 1.56 mL/L of tween 80 inoculated at a rate of 5.25% showed a growth which is 72.54% higher than that on MRS. thus, whey and lupin can replace expensive sources and used for large-scale production.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was financially supported by the laboratory of applied biochemistry and microbiology and the biochemistry department, University of Badji Mokhtar Annaba, Algeria.

The authors gratefully acknowledge Pr. A Mechakra-Maza for the scientific support and Pr. A Amrane for the LAB strain.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Amrane, A., 2000. Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J. Microb. Biot.*, 16: 207-209.
- Bulatović, M.L., B.R. Marica, V.M. Ljiljana, B.N. Svetlana, S.V.S. Maja and P.D.V. Aleksandra, 2014. Improvement of production performance of functional fermented whey based beverage. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 20(1): 1-153.
- Chango, A., C. Villaume, H.M. Bau and J.P. Nicolas, 1995. Fractionation by thermal coagulation of lupin proteins: Physicochemical characteristics. *Food Res. Int.*, 28: 91-99.
- Dervas, G., G. Doxastakis, S. Zinoviadi and N. Triandafillakos, 1999. Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chem.*, 66: 67-73.
- Djehri-Hocine, B., M. Boukhemis, N. Zidoune and A. Amrane, 2006. Horse bean extract for the supplementation of lactic acid bacteria culture media. *J. Food Technol.*, 4(4): 299-302.
- Djehri-Hocine, B., M. Boukhemis, N. Zidoune and A. Amrane, 2007a. Growth of lactic acid bacteria on oilseed crop pea- and chickpea-based media. *World J. Microb. Biot.*, 23(6): 765-769.
- Djehri-Hocine, B., M. Boukhemis, N. Zidoune and A. Amrane, 2007b. Evaluation of de-lipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol.*, 60(4): 292-296.
- Djehri-Hocine, B., M. Boukhemis and A. Amrane, 2010. Formulation and Evaluation of a selective medium for lactic acid bacteria-validation on some dairy products. *Am. J. Agr. Biol. Sci.*, 5(2): 184-153.
- Dong, Z., L. Lei Gu, J. Zhang, M. Miao Wang, G. Du, J. Chen and H. Li, 2014. Optimisation for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. *Int. Dairy J.*, 34: 230-236.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.

- Erbas, M., M. Certel and M.K. Uslu, 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). Food Chem., 89: 341-345.
- Georgiva, R., D. Koleva, D. Nikolova, D. Yankov and S. Danova, 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. Biotechnol. Biotec. Eq., 23: 861-865.
- Gulewicz, P., C. Martí'nez-Villaluenga, J. Frias, D. Ciesiołka, K. Gulewicz and C. Vidal-Valverde, 2008. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. Food Chem., 107: 830-844.
- Hassinen, J., G. Durbin, R. Tomarelli and F. Bernhart, 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. J. Bacteriol., 62: 771-777.
- Horn, S.J., S.I. Aspino and V.G.H. Eijsink, 2007. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. Enzyme Microb. Tech., 40: 1328-1334.
- Hujanen, M. and Y.Y. Linko, 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. Biot., 45: 307-313.
- JuárezTomás, M.S., E. Bru, B. Wiese and M.E.F. Nader-Macías, 2010. Optimization of low-cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a urogenital *Lactobacillus salivarius* strain. Probiotic Antimicrob. Prot., 2: 2-11.
- Kwon, S., P.C. Lee, E.G. Lee, Y.K. Chang and N. Chang, 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. Enzyme Microb. Tech., 26: 209-215.
- Lee, H.M. and Y. Lee, 2008. A differential medium of lactic acid-producing bacteria in mixed culture. Lett. Appl. Microbiol., 46: 676-681.
- Liu, B., M. Yang, B. Qia, X. Chena, Z. Sua and Y. Wana, 2010. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. Biochem. Eng. J., 52: 212-219.
- Louaileche, H., P. Bracquart, F. Saulnier, M. Desmazeaud and G. Linden, 1993. Carbon dioxide effects on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. J. Dairy Sci., 76: 3683-3689.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 270: 27299-27304.
- Martí'nez-Villaluenga, C. and R. Gómez, 2007. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. Int. Dairy J., 17: 116-122.
- Panesar, P.S., J.F. Kennedy, D.N. Gandhi and K. Bunko, 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chem., 105: 1-14.
- Papagora, C., T. Roukas and P. Kotzekidou, 2013. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. Food Bioprod. Process., 91: 413-420.
- Partanen, L., N. Marttinen and T. Alatosava, 2001. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. Syst. Appl. Microbiol., 24: 500-506.
- Pescuma, M., E.M. Hébert, F. Mozzi and G. Fond de Valdez, 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiol., 25: 442-451.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman, 1946. The design of optimal multifactorial experiments. Biometrika, 33: 305-325.
- Rattanachaiakunsopon, P. and P. Phumkhachorn, 2010. Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their use in food production. Ann. Biol. Res., 1 (4): 218-228.
- Rodríguez-Carrio, J., A. Fernández, F.A. Riera and A. Sáurez, 2014. Immunomodulatory activities of whey-lactoglobulintryptic-digested fractions. Int. Dairy J., 34: 65-73.
- Soares de Castro, R.J. and H.H. Sato, 2014. Functional properties and growth promotion of bifidobacteria and lactic acid bacteria strains by protein hydrolysates using a statistical mixture design. Food Biosci., 7: 19-30.
- Vázquez, J.A. and M.A. Murado, 2008. Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions. Biochem. Eng. J., 39: 176-287.
- Vázquez, J.A., S.F. Docal, M.A. Prieto, M.A. González and M.A. Murado, 2008. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-salige of fishing by-products. Bioresource Technol., 99: 6246-6257.
- Wong, N.P., D.E. Lacroix and F.E. Mcdounough, 1978. Minerals in whey and whey fractions. J. Dairy Sci., 61: 1700-1703.
- Xu, H., L. Sun, D. Zhao, B. Zhang, Y. Shi and Y. Wu, 2008. Production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* As-3951 in solidstate fermentation using spent brewing grains as substrate. J. Sci. Food Agr., 88(3): 529-535.