

Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et  
Sciences de la Nature et de la Vie



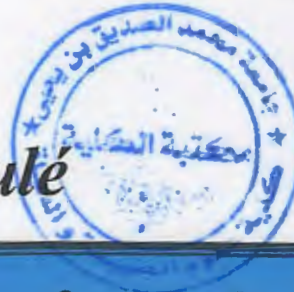
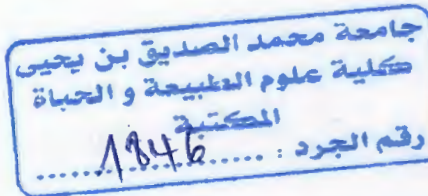
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

## Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme Master 2 en biologie

### Option : Microbiologie Appliquée



*Intitulé*

*Effets de la microencapsulation des ferments  
thermophiles locales et industriels sur les  
aptitudes probiotiques et technologiques*

Membres de jury:

Présenté par:

Président: M<sup>me</sup>. Roula Sadjia

M<sup>lle</sup>. Boulbair Hayet

Examineur: Dr. Sifour Mouhamed

M<sup>lle</sup>. Moubarek Fairouz

Encadreur: Dr. Idoui Tayeb

Année universitaire: 2011-2012

## *Remerciements*

*Avant tout nous remercions Allah tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Pour ses précieux conseils et suggestion, nous voudrions exprimer notre gratitude à notre encadreur ; Dr. Idoui Tayeb, pour son aide et son encouragement permanent, pour ses compétences et son esprit critique.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos profonds remerciement à :*

- *Dr.Sifour Mouhamed, Professeur à l'université de Jijel pour nous avoir fait lhonneur de présider le jury.*
- *M<sup>me</sup> Roula sadjia, Professeur à l'université de Jijel pour nous avoir accepté de participer à ce jury.*

*Mes très spéciaux remerciements reviennent à notre famille et notre amies pour leurs encouragements et leur compréhension.*

*Finalemnt, nous remercions de tous cœur tous ceux qui contribué de prés ou de loin à notre formation.*

## Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

### I. Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : Les ferments lactiques

I.1. Données sur les ferments lactiques et définition.....	02
I.2. Classification des ferments.....	02
I.2.1. Les ferments mésophiles.....	02
I.2.2. Les ferments thermophiles.....	03
I.3. Les ferments thermophiles de yaourt.....	03
I.3.1. L'espèce <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> .....	03
I.3.1.1. Données sur l'espèce.....	03
I.3.1.2. Ecologie et caractères généraux.....	03
I.3.2. L'espèce <i>Streptococcus salivarius</i> ssp <i>thermophil</i> .....	04
I.3.2.1. Données sur l'espèce.....	04
I.3.2.2. Ecologie et caractères généraux.....	04
I.4. Les ferments thermophiles industriels.....	07
I.4.1. La production de ferments lactiques.....	07
I.4.2. Formes commerciales.....	07
I.5. Les ferments thermophiles probiotiques.....	07
I.5.1. Définition.....	07
I.5.2. Les critères de sélection et d'efficacité des souches probiotiques.....	07
I.5.3. Le mode d'action et effets des probiotiques.....	08

#### Chapitre II : Les aptitudes technologiques et probiotiques des ferments thermophiles

II.1. Aptitude technologiques des ferments.....	09
II.1.1. Aptitude acidifiante.....	09
II.1.2. Aptitude protéolytique.....	09
II.1.3. Aptitudes lipolytique et aromatisante.....	09
II.1.4. Aptitude antagoniste.....	10
II.1.5. Propriété texturant.....	10
II.2. Aptitude probiotiques des ferments.....	10
II.2.1. La résistance aux sels biliaires.....	10
II.2.2. La résistance à l'acidité gastrique.....	10
II.2.3. L'adhésion aux cellules épithéliale.....	11
II.2.4. La production de substances antimicrobiennes.....	11

## Chapitre III: La microencapsulation des ferments Thermophiles

III.1. Définition et objectifs.....	12
III.2. Les différentes méthodes d'encapsulation.....	12
III.2.1. Méthode d'atomisation.....	12
III.2.2. Méthode d'emulsification.....	12
III.2.3. Méthode d'extrusion.....	13
III.3. Les applications industrielles de l'encapsulation.....	14
III.4. Les avantages de l'encapsulation.....	14
III.5. Les effets de microencapsulation.....	14

### II-Matériel et Méthodes

II.1. Matériel.....	15
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Revivification des souches bactériennes et le rapport <i>St. thermophilus</i> / <i>Lb. Bulgaricus</i> .....	16
II.2.2. Etude comparative des aptitudes technologiques des ferments thermophiles locales et industriels.....	17
II.2.2.1. Pouvoir acidifiant.....	17
II.2.2.2. Pouvoir aromatisant.....	17
II.2.2.3. Pouvoir protéolytique.....	18
II.2.2.4. Pouvoir lipolytique.....	18
II.2.2.5. Pouvoir texturant.....	18
II.2.3. Etude des aptitudes probiotiques des ferments locaux et industriels.....	19
II.2.3.1. Tolérance des ferments à l'acidité.....	19
II.2.3.2. Résistance aux sels biliaires.....	19
II.2.3.3. Réponse au stimulus stomaco – duodéal.....	20
II.2.3.4. Test d'auto-agrégation.....	20
II.2.3.5. Teste d'hydrophobicité.....	21
II.2.3.6. Adhésion au tissu épithélial.....	21
II.2.3.7. Activité inhibitrice des surnageants.....	22
II.2.3.8. Activité antagonistique des ferments thermophiles.....	22
II.2.4. Encapsulation des ferments thermophiles locaux et industriels.....	22
II.2.4.1. Procédure de micro-encapsulation.....	22
II.2.4.2. Estimation de nombre moyen de cellules dans chaque capsule.....	23
II.2.4.3. Etude des aptitudes technologiques des ferments locaux et industriels encapsulés dans une matrice alimentaire.....	23
II.2.4.3.1. Pouvoir acidifiant.....	23
II.2.4.3.2. Pouvoir protéolytique.....	23
II.2.4.3.3. Pouvoir texturant.....	23
II.2.4.4. Etude des aptitudes probiotiques des ferments locaux et Industriels encapsulés.....	23

### III. Résultats et Discussion

III.1.Revivification des souches et le rapport de <i>St. thermophilus</i> / <i>Lb. Bulgaricus</i> .....	24
III.2.Etude comparative des aptitudes technologiques des ferments thermophiles locales et industriels.....	25
III.2.1.Pouvoir acidifiant.....	25
III.2.2.Pouvoir protéolytique .....	26
III.2.3.Aptitudes aromatisant et lipolytique.....	28
III.2.4. Pouvoir texturant.....	29
III.3.Aptitude probiotiques des ferments.....	31
III.3.1.Tolérance des ferments à l'acidité.....	31
III.3.2.La résistance aux sels biliaires.....	34
III.3.3.Réponse au stimulus stomaco – duodéal.....	34
III.3.4.Adhésion au tissu épithélial.....	36
III.3.5. Test d'auto-agrégation.....	36
III.3.6. Test d'hydrophobicité.....	37
III.3.7.Activité inhibitrice des surnageants natifs.....	39
III.3.8.Activité inhibitrice des surnageants neutres.....	39
III.3.9.Activité antagonistique.....	40
III.4.Encapsulation des ferments thermophiles locaux et industriels.....	41
III.4.1. Etude des aptitudes technologiques des ferments locales et industriels Encapsulés dans une matrice alimentaire.....	42
III.4.1.1 .Pouvoir acidifiant.....	42
III.4.1.2. Pouvoir protéolytique.....	43
III.4.1.3. Pouvoir texturant.....	44
III.4.2.Etude des aptitudes probiotiques des ferments locales et industriels encapsulés.....	44
III.4.2.1. Résistance à l'acidité.....	44
III.4.2. 2. Résistance aux sels biliaire.....	46
III.4.2.3. Réponse au stimulus stomaco – duodéal.....	48
<b>Conclusion général.....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexe</b>	

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01:</b> Caractères physiologiques et biochimiques de <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> .....	06
<b>Tableau 02 :</b> Résultats de dénombrement des cellules des quatre ferments .....	24
<b>Tableau 03 :</b> Nombre de <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. Bulgaricus</i> après la purification.....	24
<b>Tableau 04 :</b> Activité protéolytique des ferments étudiés sur milieu YAM.....	26
<b>Tableau 05 :</b> Activité protéolytique des ferments lactiques sur le milieu A/B.....	27
<b>Tableau 06:</b> Quantité du glucose libérée par les ferments locaux et industriels.....	30
<b>Tableau 07:</b> Adhésion des ferments locaux et industriels aux cellules épithéliales du poulet.....	36
<b>Tableau 08 :</b> Résultats de l'hydrophobicité des ferments locaux et industriels vis-à-vis du xylène.....	38
<b>Tableau 09 :</b> Résultat de l'activité inhibitrice des surnageant natifs (cm).....	39
<b>Tableau 10 :</b> Résultat de l'activité inhibitrice des surnageants neutres (cm).....	40
<b>Tableau 11:</b> Résultat de l'activité antagonistique des ferments (cm).....	40
<b>Tableau 12:</b> Nombre des cellules dans la capsule.....	42
<b>Tableau 13:</b> Quantité du glucose libérée par les ferments locaux et industriels encapsulés.....	44

## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : Culture de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> sur le milieu MRS agar.....	04
<b>Figure 02</b> : Culture de <i>Streptococcus thermophilus</i> sur le milieu M17 agar.....	05
<b>Figure 03</b> : Schéma de principe d'encapsulation des bactéries par les techniques d'extrusion et de l'émulsion.....	13
<b>Figure 04</b> : Evolution d'acide lactique produit par des ferments.....	25
<b>Figure 05</b> : Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 6,5.....	31
<b>Figure 06</b> : Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 2,5.....	32
<b>Figure 07</b> : Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 2.....	32
<b>Figure 08</b> : Tolérance des ferments locales et industriels aux sels biliaries à pH 6,5.....	33
<b>Figure 09</b> : Tolérance des ferments locales et industriels aux sels biliaries à pH 2,5.....	34
<b>Figure 10</b> : Tolérance des ferments locales et industriels aux sels biliaries à pH 2.....	34
<b>Figure 11</b> : Réponse des ferments locaux et industriels au stimulus stomaco– duodéнал....	35
<b>Figure 12</b> : Résultats d'auto-agrégation des ferments locaux et industriel.....	37
<b>Figure 13</b> : Production d'acide lactique par les ferments encapsulés .....	43
<b>Figure 14</b> : Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH6, 5.....	45
<b>Figure 15</b> : Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH 2,5. ....	45
<b>Figure 16</b> : Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH 2...	46
<b>Figure 17</b> : Tolérance des ferments locaux et industriels encapsulés aux sels biliaries à pH6,5.....	47
<b>Figure 18</b> : Tolérance des ferments locaux et industriels encapsulés aux sels biliaries à p2 ,5.....	47
<b>Figure 19</b> : Tolérance des ferments locales et industriels encapsulés aux sels biliaries à pH 2.....	48
<b>Figure 20</b> : Réponse des ferments locaux et industriels encapsulés au stimulus stomaco– duodéнал.....	49

## Liste des Photos

<b>Photo 01:</b> Activité protéolytique des ferments sur milieu YMA.....	26
<b>Photo 02 :</b> Activité protéolytique des ferments lactiques sur bouillon nutritif.....	27
<b>Photo 03 :</b> Pouvoir protéolytique des ferments lactiques sur le milieu A/B.....	28
<b>Photo 04 :</b> Pouvoir aromatisant des ferments thermophiles locaux et industriels.....	29
<b>Photo 05 :</b> Pouvoir texturant sur milieu hypersaccharosé.....	30
<b>Photo 06:</b> Adhésion de ferment <b>F2</b> aux cellules épithéliales... ..	36
<b>Photo 07 :</b> Résultat d'auto-agrégation du ferment <b>F2</b> .....	37
<b>Photo 08 :</b> Hydrophobicité des ferments locaux et industriels vis-à-vis du xylène.....	38
<b>Photo 09:</b> Résultat de l'effet du surnageant natifs des ferments étudiés vis-vis de <i>Klebsiella sp.</i> .....	39
<b>Photo 10 :</b> Activité antibactérienne des ferments sur <i>Listéria monocytogenes</i> .....	41
<b>Photo11:</b> Aspect des billes des ferments encapsulés. ....	41
<b>Photo 12:</b> Photomicrographie des cellules <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> ( <b>F1</b> ) encapsulés.....	42
<b>Photo 13 :</b> Activité protéolytique des ferments lactiques sur MSR- lait écrémé.....	43
<b>Photo 14 :</b> Activité protéolytique des ferments sur bouillon YAM. ....	44



## Liste des Abréviations

**A°D** : Acide dornique

**cm** : Centimètre

**DO** : Donsité obtique

**EPS** : Exopolysacccaharides

**E** : Esgirichia

**g** : gramme

**h** : heure

**l** : Liter

**ml** : millilitre

**MRS** : Man, Rogosa et Sharpe

**Lb** : *Lactobacillus*

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**ssp** : Sous espèce

**sp** : Espèce non précisée

**St** : *Streptococcus*

**UFC** : Unité Formant Colonie

**YMA** : Yeast Milk Agar

**°C** : Degré celsius

**µl** : microlitre

# *INTRODUCTION*

Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés. Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capables de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire. Ainsi certains membres de cette famille notamment les lactobacilles sont utilisés comme probiotiques, c'est-à-dire comme une préparation microbienne vivante ayant une action bénéfique sur l'hôte (**Baliarda, 2003**).

Les ferments traditionnels ne sont pas supposés survivre à la digestion et arriver vivant dans le côlon. Les microorganismes probiotiques eux doivent être résistants de manière à survivre à la digestion et atteindre le côlon en quantité suffisante pour qu'ils puissent avoir un effet sur la santé du consommateur (**Hansen, 2011**).

Actuellement, beaucoup d'études ont montré la baisse de viabilité des probiotiques contenus dans des matrices alimentaires tel que les yaourts et les produits laitiers fermentés, ainsi, la micro-encapsulation a été utilisée pour améliorer leur viabilité (**Nan chen et al., 2005**). Des méthodes d'encapsulation ont été appliquées comme solution pour protéger les cellules viables des micro-organismes probiotiques dans un tel environnement et c'est un processus dans lequel des cellules sont maintenues dans une matrice d'encapsulation (**Krasaekoopt et al., 2003**).

Le but de notre présente étude est de répondre à la problématique suivante :

«Les ferments thermophiles locales et industriels encapsulés sont-ils réellement plus performants sur le plan technologique et probiotique que ceux libres» ?

Ce travail fait suite à celui déjà abordé par les étudiantes **Messaïd** et **Younsi** en 2011 sous l'intitulé « Etude comparative des aptitudes technologiques et probiotiques des ferments mixtes et pures micro-encapsulés et des cellules libres ».

Notre manuscrit est composé de deux parties, une bibliographique composée de 3 chapitres dont les deux premiers chapitres font état de connaissances sur la présentation des ferments lactiques et les aptitudes technologiques et probiotiques de ces ferments, le dernier chapitre traite la micro-encapsulation des ferments.

En ce qui concerne la partie pratique, elle est articulée autour des points suivants :

- Etude comparative des aptitudes technologiques des ferments thermophiles locales et industriels
- Etude des aptitudes technologiques et probiotiques des ferments locales et industriels encapsulés
- 

Finalement, une conclusion générale permet récapituler les principaux résultats de ce travail.

*Partie I :*

*SYNTHESE*

*bibliographique*

## Chapitre I : Les ferments lactiques

### I.1. Données sur les ferments lactiques et définition

Les ferments lactiques sont des cultures pures en proportion définies de différentes bactéries lactiques, qui en se multipliant dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctions essentielles (**Gagnon, 2006**):

- Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique, cette acidification intervient comme facteur de coagulation de lait ;
- Contribuer aux caractères organoleptiques des produits.

Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés (**Doleyres, 2003**).

Récemment, l'utilisation des nouveaux starters « fonctionnelle » d'un grand intérêt industriels et nutritionnelle a été mise au point, ces starters complètent les apports des starters classiques et concourent à l'amélioration et à l'optimisation des processus de fermentation et de la qualité des produits finis (**Nguyet Thu, 2008**).

Les ferments lactiques sont des ferments capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie (**Robin et Rouchy, 2001**):

- Les lactobacilles : *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*
- Les coques : *Enterococcus* et *Streptococcus*.

### I.2. Classification des ferments

Les ferments lactiques sont généralement classés en deux groupes, les ferments mésophiles et les ferments thermophiles.

#### I.2.1. Les ferments mésophiles

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance proche de 30°C et comprennent toujours des souches de *Lactococcus cremoris* et de *Lactococcus lactis*.

A ces souches peuvent s'ajouter *Lactococcus diacetylactis* (ferment de type D) ou *Leuconostoc* (ferment de type L), bactéries dites aromatisantes de par leur synthèse de diacétyle. Ainsi un ferment DL est un ferment composé d'un mélange de *Lc. cremoris*, *Lc. lactis*, *Lc. diacetylactis* et de *Leuconostoc* (**Doleyres, 2003**).

### I.2.2. Les ferments thermophiles

Ces derniers ont une température optimale de croissance variant de 37°C à 43°C et sont généralement formés des espèces de bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ou *Lb. delbrueckii* (sous espèces *bulgaricus*) (Gagnon, 2006).

Certaines cultures (lactobacilles, bifidobactéries, *Streptococcus thermophilus*) sont appelées thermophiles dans le secteur laitier car leur température optimale de croissance se situe entre 37°C et 47°C (Doleyres, 2003).

### I.3. Les ferments thermophiles de yaourt

#### I.3.1. L'espèce *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*

##### I.3.1.1. Données sur l'espèce

*Lb. bulgaricus* appartient au sous-genre *Thermobacterium* du genre *Lactobacillus* (Malcinga, 1985). Parmi le genre *Lactobacillus*, figure la sous espèce *bulgaricus* (Grattepanche, 2005).

*Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* est d'une importance vitale pour l'industrie alimentaire, en particulier à l'industrie laitière (Cui et al., 2012). C'est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ 42°C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Henry, 2011).

##### I.3.1.2. Ecologie et caractères généraux

C'est une bactérie typique du lait, elle cultive mal dans d'autres milieux. Elle est thermophile (cultive à 45°C et même entre 50-52°C) (Malcinga, 1985). L'analyse du génome de *L. bulgaricus* nous montre que ce probiotique est en pleine évolution, ce qui apparaît comme une adaptation au lait, milieu riche en lactose et en protéines (Maarten Van, 2006).

*Lb. bulgaricus* est un bacille gram positif, asporulé, micro-aérophile. Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets à bords arrondis, seules ou en longues chaînes (Righi, 2006). Ce sont des cellules immobiles, leur taille est en moyenne de 4 à 6 µm de diamètre (Malcinga, 1985). Cette espèce possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principale produit final (homofermentaire). (Henry, 2011).

En milieu gélosé (MRS), elle donne des colonies lenticulaires souvent polylobées. Son activité protéolytique est grande et fournit des acides aminés variés. (Malcinga, 1985). La figure 01, illustre l'aspect des colonies sur milieu MRS.



Figure 01 : Culture de *Lb. bulgaricus* sur le milieu MRS (Hansen, 2011).

### I.3.2. L'espèce *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus*

#### I.3.2.1. Données sur l'espèce

Pendant plusieurs années, l'espèce *St. thermophilus* était classée comme une sous-espèce de *St. salivarius* (*St. salivarius* ssp. *thermophilus*) (Henry, 2011). *St. thermophilus* appartient au groupe viridans du genre *Streptococcus* (Malcinga, 1985). Chez le genre *Streptococcus*, *St. thermophilus* est la seule espèce utilisée pour la préparation de produits alimentaires fermentés (Gagnon, 2006).

Cette bactérie est souvent utilisée dans les fermentations laitières nécessitant l'atteinte de températures relativement élevées (jusqu'à 55°C) et est souvent associée en ferment à un *Lactobacillus* thermophile (Gagnon, 2006).

Cependant, bien qu'ayant une forte capacité d'acidification du lait, *St. thermophilus* ne permet quasiment jamais d'abaisser seule le pH du lait en dessous d'un pH de 4,8 (Henry, 2011).

#### I.3.2.2. Ecologie et caractères généraux

La seule niche écologique de *St. thermophilus* connue est le lait où cette bactérie se développe de façon optimale à une température de croissance comprise entre 42°C et 44°C (Henry, 2011). Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *St. thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (Henry, 2011).

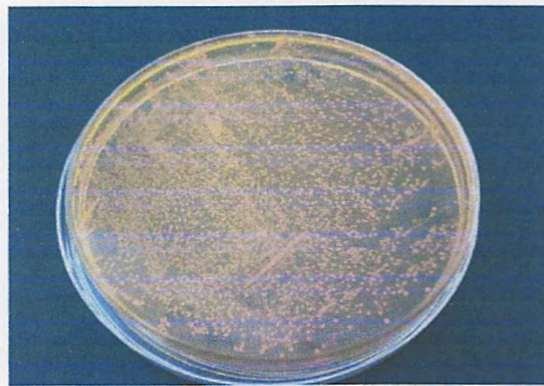
*St. thermophilus* est une bactérie gram positif, anaérobie facultative. C'est une cocci sphérique à ovoïde immobile, de diamètre 0,7- 0,9 µm, en paires et en chaînes (Harnett et al., 2011).

Elle a été décrite pour la première fois par Orla- Jensen en 1919. Le génome de *St. thermophilus* s'organise en une unité chromosomique unique dont la taille est de 1,82pb (Henry, 2011).

C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques (0,1 U.I. de pénicilline de lait) (Henry, 2011).

En milieu gélosé (M 17), elle forme des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre, le Streptocoque ne cultive pas dans un milieu contenant 2 % de NaCl, ce caractère le différenciant nettement des streptocoques du groupe sérologique D (culture dans un milieu à 6,5 % de sel). La plupart des souches de *St. thermophilus* ne peuvent métaboliser la molécule de galactose issue de l'hydrolyse du lactose, ce qui résulte en l'accumulation de ce sucre dans le milieu de fermentation (Gagnon, 2006).

Son métabolisme est du type homofermentaire. Sa température optimale de croissance est comprise entre 42 et 44°C, mais elle est capable de se développer, certes plus lentement, entre 19°C (température minimale) et 30°C (Henry, 2011). La figure 02, illustre l'aspect des colonies sur milieu M17.



**Figure 02 :** Culture de *St. thermophilus* sur le milieu M17 ( Righi, 2006).

Cependant, le tableau 01, regroupe les caractères morphologiques et biochimiques de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*



**Tableau 1:** Caractères physiologiques et biochimiques de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* (Xanthopoulos et al., 2001).

Caractéristiques	<i>St. thermophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>
<b>Croissance à:</b>		
10 °C	-	NT
à 15 °C	NT	-
à 45 °C	+	+
<b>Croissance en présence de</b>		
NaCl 2%	-	-
NaCl 4%	-	-
NH <sub>3</sub> à partir de l'arginine	-	-
<b>Fermentation des sucres</b>		
Glucose	+	+
Galactose	V	+
Lactose	+	+
Saccharose	+	-
Maltose	-	-
Mannose	-	-
Trehalose	-	-
Mannitol	-	-
Isomère de l'acide lactique	NT	D(-)
Acide lactique dans lait (%)	NT	< 1,8
+: Reaction positive    -: Reaction negative    V: Reaction variable    NT: Non tester.		

## **I.4. Les ferments thermophiles industriels**

### **I.4.1. La production de ferments lactiques**

La production de ferments est généralement effectuée en fermenteur, en discontinu ou en continu, dans le lait ou dans un milieu commercial répondant aux besoins de ces bactéries nutritionnellement exigeantes.

Puisque la production de biomasse génère une quantité importante d'acide lactique dans le milieu, le contrôle externe du pH permet de moduler ce facteur par l'addition de neutralisant dans le milieu (**Doleyres, 2003**).

Depuis les années 1980, les bactéries et les ferments lactiques sont utilisés sous forme concentrée congelée ou lyophilisée pour fabriquer des produits laitiers par ensemencement direct. Ces techniques permettent de simplifier, standardiser et sécuriser les procédés de fabrication, facilitant aussi les innovations (**Soustre, 2009**).

### **I.4.2. Formes commerciales**

Les ferments lactiques et probiotiques sont généralement commercialisés sous forme concentrée, pour limiter les volumes transportés et les coûts qui en découlent. Les ferments concentrés commerciaux se caractérisent par des concentrations bactériennes d'au moins  $10^9$  et  $10^{12}$  ufc/g, alors que les ferments non concentrés doivent contenir au moins  $10^8$  ufc/g.

La commercialisation des ferments concentrés nécessite leur stabilisation préalable, soit par congélation, soit par lyophilisation. Cette stabilisation permet de les conserver, à la température préconisée, pendant plusieurs semaines, voir plusieurs mois. Les cultures concentrées congelées doivent être stockées à une température inférieure à  $-45^{\circ}\text{C}$  puis décongelées soit avant l'ensemencement, soit directement dans la cuve de fabrication.

Les ferments lyophilisés sont généralement conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  au  $-18^{\circ}\text{C}$ , en absence d'oxygène, à l'abri de la lumière, et doivent être réhydratés avant l'utilisation (**Luquet et Corrieu, 2008**).

## **I.5. Les ferments thermophiles probiotiques**

### **I.5.1. Définition**

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, administrés en quantités adéquates confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (**Rieu, 2012**).

### **I.5.2. Les critères de sélection et d'efficacité des souches probiotiques**

Les bactéries lactiques sont principalement sélectionnées pour leurs activités acidifiantes et protéolytiques dans les ferments classiques, d'autres propriétés doivent être étudiées dans le cas des probiotiques.

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (**Doleyres, 2003**).

De nombreux produits alimentaires et préparations contenant des souches probiotiques de *Lactobacillus* sont commercialisés (**Grattepanche, 2005**).

Selon **Maarten Van. (2006)** et **Hermann (2011)**, les critères d'efficacité d'un ferment lactique ou probiotique s'appuient sur ce qui suit :

- . Origine connue et identification précise des souches probiotiques ;
- . Innocuité pour l'homme;
- . Survie des probiotiques durant le processus de fabrication du produit;
- . Stabilité des probiotiques pendant toute la durée de conservation du produit;
- . Résistance suffisante aux acides gastriques et aux sels biliaires;
- . Capacité d'interaction avec la muqueuse intestinale (colonisation de l'épithélium intestinal);
- . Effets bénéfiques démontrés par des études scientifiques.

Aucun microorganisme génétiquement modifié n'est actuellement autorisé à la commercialisation pour être utilisé en tant que tel dans l'alimentation humaine (**Hermann, 2011**).

### **I.5.3. Le mode d'action et effets des probiotiques**

Les probiotiques jouent un rôle très important sur la santé humaine, ils sont composés de différentes espèces bactériennes chacune avec une activité métabolique propre (**Rieu et al., 2012**).

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substance antimicrobienne) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif (**Ait Belgnaoui, 2006**).

Les effets probiotiques ont été attribués:

- A la production d'acide et la production de bactériocines (**Krasaekoopt et al., 2003**).
- A la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (**Rieu et al., 2012**).
- A la digestion du lactose des produits laitiers au niveau de l'intestin grêle par une enzyme membranaire (**Burgain et al., 2012**).
- A l'efficacité de la digestion du lactose par les ferments des yaourts. Il existe également des auxiliaires technologiques qui vont permettre d'hydrolyser ou supprimer le lactose présent dans les produits alimentaires (**Gaiani et al., 2011**).
- A l'activité anti-cholestérol (contradictoire) (**Hermann, 2011**).
- A certaines propriétés anti-cancérogènes, anticholestérolémiques et anti-diarrhéiques (**Doleyres, 2003**).

## Chapitre II : Les aptitudes technologiques et probiotiques des ferments thermophiles

### II.1. Aptitude technologiques des ferments

#### II.1.1. Aptitude acidifiante

L'acidification est définie comme le résultat de la fermentation du lait par des bactéries lactiques avec une dégradation du lactose entraînant une production d'acide lactique et donc une baisse notable du pH (Morge, 2004).

L'acide lactique et les autres composés qui en résultent jouent un rôle important sur les propriétés organoleptiques du produit. *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* fermentent le lactose selon la voie homofermentaire de la glycolyse (Malcinga, 1985).

Les souches de *Lb. bulgaricus* présentent une plus grande activité d'acidification et produit plus d'acétaldéhyde à pH 4,6 que la culture de souches de *St. thermophilus* (Xanthopoulos et al., 2001). Il conviendrait de rappeler que la fabrication du yaourt utilise originellement deux bactéries, *Lb. bulgaricus* se multipliant à 45 – 50 °C et acidifiant fortement de lait, *St. thermophilus* se multipliant à 37 – 40 °C acidifiant faiblement de lait (Xanthopoulos et al., 2001).

#### II.1.2 .Aptitude protéolytique

Pour assurer leur développement dans le lait, les fermentes lactiques possèdent un système protéolytique capable de dégrader les caséines en acides aminés (Grattepanche, 2005). Le système protéolytique de *St. thermophilus* est plus limité que celle de la plupart des starters laitiers (Harnett et al., 2011).

Les enzymes impliquées dans la dégradation des caséines du lait durant la maturation incluent la présure, le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides. Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (Gagnon, 2006).

Les lactobacilles sont très protéolytiques alors que *St. thermophilus* est moins protéolytique. Cultures mixtes, à l'exception d'une combinaison, libéré plus de tyrosine à la somme des cultures individuelles (Rajagopal et Sandine, 2010).

#### II.1.3 .Aptitudes lipolytique et aromatisante

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils (Gagnon, 2006). L'activité métabolique des bactéries lactiques fournit de nombreux composés volatils ou non, qui contribuent à l'arôme du bon yaourt (Malcinga, 1985).

Les autres saveurs et arômes seront fonction des souches utilisées produisant des composés intermédiaires comme l'acétaldéhyde (arôme du yaourt) (Soustre, 2009). La plupart des auteurs attribuent un rôle de premier plan à l'acétaldéhyde produit essentiellement par *Lb. bulgaricus* (Malcinga, 1985).

Les acides aminés libres contribuent directement ou comme composés précurseurs d'arômes. Le facteur limitant la production de composés aromatiques serait relié à la capacité bactérienne de conversion des acides aminés en ces composés (**Gagnon, 2006**).

#### II.1.4. Aptitude antagoniste

Le pouvoir antagoniste des bactéries lactiques résulte de la production du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines limitant la croissance de certains germes pathogènes **Ammor et Mayo, (2006)**.

Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques (**Grattepanche, 2005**). Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'auto inhibition, et/ou des autres souches constituant le levain (**Grattepanche, 2005**).

#### II.1.5. Propriété texturant

L'exopolysaccharide produit par des souches lactiques est important pour la texture finale du yogourt (**Harnett et al., 2011**). De nombreuses souches de *St.thermophilus* synthétisent des polysaccharides extracellulaires. Ces molécules peuvent être produites sous forme de capsules qui sont étroitement associés à la cellule, la production in situ par cette espèce ou d'autres bactéries lactiques laitières confèrent généralement un souhaitable "filant" ou la texture visqueuse des produits laitiers fermentés (**Broadbent et al., 2010**).

*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, peut produire des exopolysaccharides (EPS) dans des conditions différentes (**Surawicz, 2010**).

### II.2.Aptitude probiotiques des ferments

#### II.2.1.La résistance aux sels biliaires

Les résistances aux sels biliaires constituent par conséquent une caractéristique importante à prendre en compte lors de la sélection des cultures probiotiques pour une utilisation ultérieure dans les produits laitiers fermentés (**Doleyres, 2003**).

La lactase retrouvée au niveau membranaire des bactéries du yaourt, est très facilement attaquée par les acides biliaires (sécrétés lors de la digestion) (**Robin et Rouchy, 2001**).

La résistance des probiotiques aux sels biliaires de façon à arriver vivants sur leur lieu d'action qui est l'intestin est une notion très importante pour le caractère probiotique, ainsi, il a été rapporté que les souches humaines naturellement adaptées à notre environnement digestif sont les plus résistantes (**Hermann, 2011**).

#### II.2.2. La résistance à l'acidité gastrique

La sécrétion gastrique constitue le premier mécanisme de défense contre la majorité des micro-organismes ingérés (**Drouault et Corthier, 2001**). L'aliment dans lequel les bactéries sont ingérées influe sur leur taux de survie dans le tractus digestif. Il est en effet bien établi que les produits laitiers fermentés ont un fort pouvoir tampon dans l'estomac qui a pour effet de protéger les bactéries (**Drouault et Corthier, 2001**). De plus, un enrobage résistant au suc gastrique permettra aux souches d'arriver intactes dans l'intestin (**Hermann, 2011**).

### II.2.3. .L'adhésion aux cellules épithéliale

Une propriété importante des bactéries probiotiques réside dans leur capacité à adhérer aux parois intestinales. En effet, ceci leur confère une compétitivité avantageuse dans le but de résider à long terme dans le gros intestin (Doleyres, 2003).

Les lactobacilles probiotiques assurent une régénération de la muqueuse digestive inflammée qui se trouve ainsi relaxée et apaisée (Fanos et Bielory, 2008).

La surface épithéliale de l'intestin est essentielle pour l'absorption des substances nutritives et constitue également une barrière entre le corps et l'environnement externe qu'est la lumière intestinale (Drouault et Corthier, 2001).

Les probiotiques améliorent ainsi l'utilisation de la ration alimentaire de manière indirecte en agissant sur la microflore intestinale ou au niveau des cellules épithéliales du tube digestif de l'hôte. Les probiotiques stimulent l'activité enzymatique des microorganismes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments ingérés. Ils stimulent également l'activité lactase, invertase et maltase des cellules épithéliales du tube digestif (Robin et Rouchy, 2001).

### II.2.4. .La production de substances antimicrobiennes

A côté des composés comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyle, les bactéries lactiques des levains inhibent les germes indésirables en produisant des bactériocines (Rizk, 2005).

La présence dans le colon de lactobacilles probiotiques en quantité suffisante permet une acidification du milieu, ce qui a pour effet d'inhiber la prolifération des bactéries nocives par effet de compétition (Fanos et Bielory, 2008).

La croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* est symbiotique produisant rapidement de l'acide lactique qui inhibe la croissance des bactéries putrifactives (Grattepanche, 2005). La sécrétion de bactériocines (peptides ou protéines ayant une activité antibactérienne) joue un rôle dans la conservation des produits (Soustre, 2009).



## Chapitre III: La microencapsulation des ferments thermophiles

### III.1. Définition et objectifs

L'encapsulation est un procédé physico-chimique ou mécanique qui vise le piégeage d'une substance dans un matériau afin de produire des particules avec des diamètres de quelques nanomètres à quelques millimètres (**Burgain et al., 2011**).

La microencapsulation est généralement destinée à préserver la viabilité des microorganismes, tels que les cultures probiotiques, dans les aliments et le tractus gastro-intestinal (**Grattepanche, 2005**).

La microencapsulation est une technologie puissante qui a été développée pour une utilisation dans l'industrie alimentaire qui permet la protection des cellules bactériennes. Cependant, des cellules probiotiques microencapsulées exigent un traitement spécifique, étapes qui compliquent la fabrication du produit alimentaire et augmentent son coût (**Burgain et al., 2011**).

La microencapsulation est un des moyens efficace pour protéger les cellules viables des microorganismes probiotiques et c'est un processus dans lequel des cellules sont maintenues dans une matrice d'encapsulation (**Bueno et al., 2010**).

### III.2. Les différents méthodes d'encapsulation

Les techniques d'encapsulation appliquées aux probiotiques pour l'utilisation dans la production de lait fermenté ou la production de biomasse peuvent être classées en méthodes d'atomisation, d'emulsification et d'extrusion.

#### III.2.1. Méthode d'atomisation

Les cellules probiotiques se trouvent dans une solution qui est pulvérisée en phase vapeur d'un liquide cryogénique tel que l'azote liquide. Cette étape génère une dispersion de gouttelettes congelées. Gouttelettes congelées sont ensuite séchées dans un lyophilisateur (**Burgain et al., 2011**).

Malgré les nombreux avantages de la méthode de séchage par atomisation, la haute température nécessaire pour faciliter l'évaporation de l'eau baisse la viabilité des probiotiques et réduit leur activité dans le produit fini (**Rokka et Rantamak, 2010**).

#### III.2.2. Méthode d'emulsification

Le principe de cette technique est basé sur la relation entre la phase discontinue (suspension bactérienne plus solution colloïdale) et la phase continue (grand volume d'huile végétale). Un agent de solidification (chlorure de calcium) est ensuite ajouté à l'émulsion.

La technique de l'émulsion est facile et donne un taux de survie élevé de la bactérie. L'émulsion est une procédé permet la production des microcapsules de taille varie selon la vitesse d'agitation et le rapport eau / huile. Les billes de gel peuvent être introduites dans une seconde solution de polymère pour créer une couche de revêtement qui procure une membrane. La polymérisation inter faciale est utilisée pour encapsuler des micro-organismes afin d'améliorer leur productivité en cours de fermentation (**Burgain et al., 2011**).

### III.2.3.Méthode d'extrusion

La microencapsulation de cellules probiotiques par extrusion consiste à projeter la solution colloïdale contenant les cellules. Le mélange obtenu est introduit dans une disposition d'extrusion, en général une seringue.

Une pression exercées sur le piston de la seringue laisse tomber goutte à goutte le contenu de la seringue dans une solution gélifiante, sous une faible agitation.

L'extrusion est une méthode simple et pas cher qui utilise une opération douce qui ne cause aucun dommage à la cellule probiotique et donne une viabilité élevée.

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle est difficile à utiliser dans les grandes productions échelle en raison de la lente formation des microbilles (Burgain et al., 2011).

W. Krasaekoopt et al. / International Dairy Journal 15 (2003) 5–15

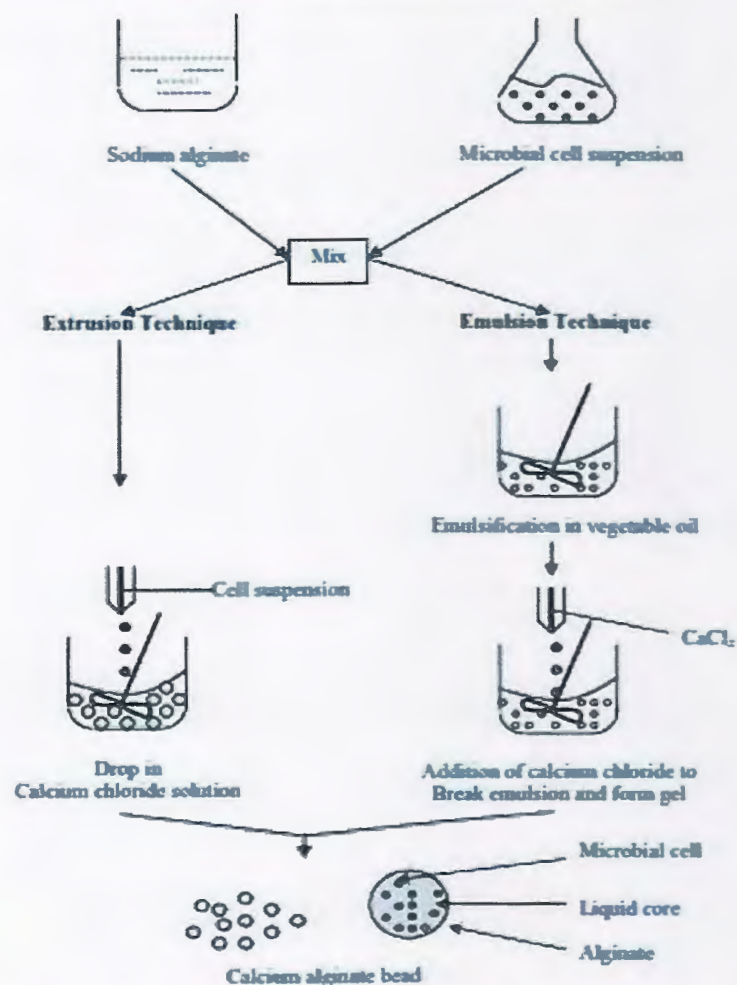


Fig. 1. Flow diagram of encapsulation of bacteria by the extrusion and emulsion techniques.

**Figure 03 :** Schéma de principe d'encapsulation des bactéries par les techniques d'extrusion et de l'émulsion (Krasaekoopt et al., 2003).



### III.3. Les applications industrielles de l'encapsulation

En raison des nombreux avantages offerts par l'encapsulation :

- Le microorganisme piégé peut être utilisé à profit pour la production de produits laitiers comme le yaourt, fromage et des produits laitiers congelés, ainsi que pour la production de biomasse (**Krasaekoopt et al., 2003**).
- L'encapsulation des composants bioactifs peut être utilisée dans de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire: réaction de l'oxydation, des saveurs, de couleurs et de masquage des odeurs, fournissant soutenue et la libération contrôlée, la durée de vie de probiotique, etc. (**Burgain et al., 2011**).

### III.4. Les avantages de l'encapsulation

De nombreux défis existent lors de l'examen microencapsulation de cellules vivantes probiotiques comme la sélection des souches probiotiques pour son avantages pour la santé et de la quantité besoin d'avoir des effets positifs (**Gbassi, 2010 ; Burgain et al., 2011**) :

- La stabilité des cellules au cours des étapes de traitement et de stockage et enfin, les effets sur les propriétés sensorielles de l'aliment ;
- Encapsulation est utilisée pour protéger les cellules contre un effet négatif de l'environnement plus une libération contrôlée ;
- Afin d'améliorer la survie des probiotiques, par exemple, l'amidon granulaire améliore la viabilité des cultures au cours du séchage et de stockage ;
- Permet de contrôler la libération de la substance encapsulée.

### III.5. Les effets de microencapsulation

La limitation des transferts de masse dans les matrices d'immobilisation crée un environnement adverse pour le développement des cellules. Ces conditions peuvent s'apparenter à des stress environnementaux tels qu'un pH acide, un manque de nutriment et l'absence d'oxygène pour certains microorganismes aérobies stricts (**Grattepanche, 2005**).

Les bactéries possédant des capacités d'adaptation aux stress remarquables, la physiologie et la morphologie des cellules peuvent ainsi présenter des comportements très différents selon qu'elles sont immobilisées ou sous une forme planctonique. ont ainsi observé le passage d'un métabolisme homofermentaire à hétérofermentaire chez des cellules de *Lb. plantarum* immobilisées durant une fermentation continue (**Grattepanche, 2005**).



*Partie II :*

*Matériels et Méthodes*

## II. Matériel et Méthodes

### II.1. Matériel

Pour la réalisation de différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

#### II.1.1. Les souches bactériennes

Les espèces de bactéries lactiques d'origine locales ( Beurre de brebis) , utilisées au cours de cette étude ont été identifiées par des techniques de microbiologies classique couplée à un logiciel API LAB (**Idoui, 2008**). Il s'agit de souches thermophiles à usage industriel et qui sont :

- Ferment mixtes **F1** : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*
- Ferment mixtes **F2** : *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*.

Les espèces de bactéries lactiques d'origine industrielle nous ont été fournies par le responsable de la laiterie Igilait, wilaya de Jijel. Il s'agit de :

- Ferment industriel de type I (**I1**) : YC/CHR HANSEN 666/819D.37.8.106.
- Ferment industriel de type II (**I2**) : CHR HANSEN.

Les souches bactériennes de référence ont été utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des ferments, il s'agit des souches suivantes :

- *Klebsiella* sp ;
- *E.coli* ;
- *Bacillus subtilis* ;
- *Staphylococcus aureus* ;
- *Listeria monocytogenes*.

#### II.1.2. Les sels biliaires et l'alginate de sodium de gard alimentaire (Louis François)

Les sels biliaires de provenance Institut Pasteur d'Alger ont été utilisés pour l'étude du pouvoir des ferments lactiques ; locales et intistriels, microencapsulées et libre à résister à cet inhibiteur dans un milieu liquide

L'alginate de sodium c'est un matrice utilisée pour réalisation de la micrencapsulation . Les alginates se présentent sous forme poudreuse de granulométrie très fine et de couleur blanchâtre.

#### II.1.3. Le tissu d'iléum

Après le sacrifice d'un poulet de chair, la partie iléale ainsi qu'une partie du colon ont été isolées afin d'étudier la capacité des ferments locaux et industriels à adhérer in vitro à ces tissus.

#### II.1.4. Pancréatique

Dans cette étude nous avons utilisés l'enzyme pancréatique la gamme pharmaceutique «Swiss herbar<sup>R</sup> »

#### II.1.5. Les milieux de culture

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

- Milieux MRS (Man- Rogosa-Sharp) liquide et gélose ;
- Gélose et bouillon nutritive ;
- Gélose A /B ;
- Gélose et bouillon hybersaccharosé ;

- Gélose triglycéride ;
- Milieu YMA ;
- Lait écrémé.

### II.1.6. Les produits chimiques et les réactifs

- Violet de gentiane, fushine, lugol, alcool: pour la coloration de gram ;
- Cristal violet 0,5% filtré : pour la coloration du tissu d'iléum et la coloration des billes de microencapsulation ;
- La soude de NaOH à (1/N) et (3/N), acide acétique pour l'ajustement de pH ;
- La soude dornic (N/9) et phénophtaléine à 1% : pour la détermination de l'acidité ;
- Acide sulfurique, phénol, éthanol : pour le dosage des exopolysaccharides ;
- L'huile à immersion pour l'observation microscopique ;
- Xylène: pour le teste de hydrophobicité ;
- Sulfate de cuivre : pour le teste de lipolytique ;
- Vp I solution alcoolique d' $\alpha$ -naphtol ;
- Vp II solution aqueuse de soude 16%.

### II.1.7. Les tampons

- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) ;
- Solution de Ringer;
- Tampon phosphate urée sulfate magnésium ;
- Chlorure de calcium (0,05M);
- Tampon phosphate 1M ( $k_2HPO_4$ ,  $kH_2PO_4$ );
- Eau physiologique stérile.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Revivification des souches et estimation du rapport *St.thermophilus* / *Lb. bulgaricus* (*St* / *Lb*)

**Revivification des souches :** Pour vérifier et contrôler la composition de ferments thermophiles locale et industriel, on a réalisé une coloration de Gram.

Les souches ont été cultivées sur le bouillon MRS et incubée à 37°C pendant 24h, le développement des bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube.

La pureté des souches a été vérifiée sur gélose MRS. Les boîtes de Pétri contenant la gélose MRS préalablement coulée et solidifiée ont étéensemencées par stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h, la souche est dite pure si on obtient des colonies homogènes et blanche de même forme, même taille. Enfin, pour confirmer encore une fois la pureté des souches, on a réalisé une coloration de Gram.

**Rapport *St/ Lb* :** Chaque bouillon MRS a étéensemencé par un des ferments locales codés **F1** et **F2** et industriel type I (**I1**) et type II (**I2**).

Après incubation à 37°C pendant 24h, une micro- dilution jusqu'à  $10^{-7}$  a été réalisée. Le nombre de cellules viables de chaque souche thermophile a été déterminé par usage de la cellule de Malassez.

## II.2. 2.Etude comparative des aptitudes technologiques des ferments thermophiles locaux et industriels

### II.2.2.1.Pouvoir acidifiant

Ce pouvoir permet de déterminer l'activité métabolique de microorganismes acidifiants par titration de l'acidité.

La méthode utilisée est basée sur la mesure de l'évolution du pH dans un lait écrémé reconstitué à 12% pasteurisé et refroidis à la température d'ensemencement (Hariri et al., 2009).

On a commencé tout d'abord à préparer quatre tubes contenant chacun 9 ml de lait et 1ml de ferment. Après une incubation à 37°C pendant 24h, le contenu de chaque tube a été transvasé dans un flacon contenant 200 ml du lait.

**Détermination du pH :** Le pH a été déterminé directement en utilisant un pH mètre, en plongeant l'électrode dans un bécher contenant 20 ml de l'échantillon (Hariri et al., 2009). La valeur du pH a été lu directement sur écran du pH mètre.

**Détermination de l'acidité :** Les dosages d'acidité sont faits chaque 2h d'incubation. Pour le dosage proprement dit, 10 ml de lait est transfère dans un bécher , puis ajouté de 5 gouttes de phénolphtaléine( reconstituée à 1% dans l'alcool ), cette inoculum est titré avec de la soude dornic jusqu' au virage au rose pâle persistant (Hariri et al., 2009).

Les résultats sont exprimés en degré Dornic (°D) selon la formule suivante (où 1°D correspond à 0,1 g /litre d'acide lactique de lait) :

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

$V_{\text{NaOH}}$  : volume de NaOH utilisée pour titrer l'acidité contenu dans les 10ml de lait fermenté.

### II.2.2.2. Pouvoir aromatisant

Pour réaliser ce test, chaque tube contenant du lait stérile a été ensemencé par un des ferments. Après incubation et coagulation du lait, on ajoute les réactifs de Vogues- Proskauer VPI et VPII, on homogénéise et on laisse reposer.

La présence d'arome est révélée par l'apparition d'un halo rouge.

### II.2.2.3. Pouvoir protéolytique

**Sur milieu YMA :** Les fermentes lactiques possèdent un système protéolytique capable de dégrader les caséines en acides aminés pour assurer leur développement dans le lait (Grattepanche, 2005).

Pour mettre en évidence cette activité, la gélose YMA (Yeast Milk Agar) a été coulée, solidifiée et séchée puis on a déposé des disques de papier Wattman stérile en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20 µl d'une culture jeune d'un ferment lactique locale et industriel et incubé à 37°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques.

**Sur bouillon nutritif :** quatre tubes contenant le bouillon nutritif et 0,5 ml de lait écrémé stérile ont été ensemencés par un des ferments, puis incubé en 37°C pendant 24h. Le pouvoir protéolytique se manifeste par une précipitation.

**Sur le milieu A/B :** On a testé cette activité sur le milieu A/B qu'on a préparé au laboratoire. Le milieu a été coulé et solidifié, puis quatre puits ont été confectionnés sur cette gélose, et chaque puits reçoit un volume de 20 µl d'une culture jeune d'un ferment et incubé à 37°C pendant 24h.

La protéolyse est révélée par des zones claires autour des puits.

### II.2.2.4. Aptitude lipolytique

Ce test consiste à étudier la capacité des bactéries à dégrader les lipides. Pour la réalisation de ce test, nous avons utilisé le milieu au triglycéride. Après avoir coulé et solidifié la gélose au triglycéride, un aliquot de la dilution  $10^{-6}$  de chaque culture a été étalée.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, on a ajouté le réactif au sulfate de cuivre, qu'on a laissé agir pendant 15min. Après un lavage par l'eau distillée, la présence d'une coloration bleu-vert autour des colonies indique qu'il y a production de lipase. (Guirad, 2003).

### II.2.2.5. Pouvoir texturant

**Sur la gélose hypersaccharosé :** Ce test consiste à ensemencer la gélose hypersaccharosée par les souches à tester. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition des colonies larges et gluantes (Leveau et al., 1991).

**Sur bouillon hypersaccharosé :** Pour mettre en évidence la production d'exopolysaccharide, la technique de Mozzi et al. (2001) a été appliquée:

Le bouillon hypersaccharosé (9ml) a été inoculé par 1ml d'une culture jeune de chaque ferment et incubé à 37°C pendant 48h.

Chaque culture a été centrifugée à 60000trs/20 min et le surnageant a été recueilli. Le volume du surnageant a été mélangé avec deux volumes d'éthanol à 4°C, puis incubé pendant une nuit à 4°C. Une fois l'incubation terminée, les précipités de chaque tube ont été collectés par centrifugation à 60000trs/5 min et suspendue dans un volume de 4 ml de l'eau distillée.

Enfin, 40µl de phénol à 80% et 2 ml d'acide sulfurique ont été ajoutés à 800µl de chaque échantillon récupéré. Après homogénéisation, on passe à la mesure de la densité optique à 490nm. Le taux de sucre est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage tracée avec du glucose (**Annexe III**).

### II.2.3. Etude des aptitudes probiotiques des ferments locaux et industriels

#### II.2.3.1. Tolérance des ferments à l'acidité

La technique décrite par **Hydrominus et al. (2000)** a été appliquée pour déterminer l'aptitude des ferments lactiques locaux et industriels à résister à l'acidité gastrique.

Avant de réaliser ce test, chaque ferment a été préparé en triple par culture sur bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 6000tr/8min, puis les cellules ont été suspendues dans 10 ml du bouillon MRS ajusté à différentes valeurs du pH (pH2, pH2.5 et pH6.5).

La densité optique ( $DO_{660}$ ) de chaque culture et le nombre de cellules viables (Cellule de Malassez) ont été déterminés à temps zéro heure ( $T_{0h}$ ). Les tubes ont été par la suite incubés 2h à 37°C.

La résistance des ferments à ce facteur hostile a été estimée par mesure de la densité optique à 660 nm et dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution et usage de la cellule de Malassez, après les 2h d'incubation ( $T_{2h}$ ).

#### II.2.3.2. Résistance aux sels biliaires

Pour la détermination de l'aptitude des ferments lactiques locaux et industriels à résister à la bile, la méthode décrite par **Hydrominus et al. (2000)** a été appliquée :

Avant de réaliser ce test, chaque ferment a été préparé en triple par culture sur bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 6000tr/8min, puis les cellules ont été suspendues dans 10 ml du bouillon MRS à 0,3% de sels biliaires et ajusté à différentes valeurs de pH (pH2, pH2.5 et pH6.5).

La densité optique ( $DO_{660}$ ) de chaque culture et le nombre de cellules viables (Cellule de Malassez) ont été déterminés à temps zéro heure ( $T_{0h}$ ). Les tubes ont été par la suite incubés 2h à 37°C.

La résistance des ferments à ce facteur hostile a été estimée par la mesure de la densité optique à 660 nm et dénombrement des cellules par la technique de micro-dilution et usage de la cellule de Malassez, après les 2h d'incubation ( $T_{2h}$ ).

#### II.2.3.3. Réponse au stimulus stomaco – duodéal

Pour tester la réponse des ferments lactiques locaux et industriels au stimulus stomaco – duodéal, la technique décrite par **Viscoco Pinto et al. (2006)** a été appliquée :

A partir des cultures bactériennes d'une nuit, des dilutions (1/10) dans la solution de Ringer ont été réalisées afin de déterminer la densité optique  $DO_{660}$  et le nombre de cellules de chaque dilution. 10 ml du bouillon à pH3 a été inoculé par 1ml de cette suspension bactérienne diluée,

suivie d'une détermination de la densité optique  $DO_{660}$  et détermination du nombre de cellules (technique de micro-dilution et usage de la cellule de Malassez) à temps zéro heure.

Après 1h d'incubation, on ajoute 4 ml de sels biliaires reconstitués à raison de 10 % et 17 ml d'une sécrétion duodénal synthétiques, les cultures sont par la suite incubées à 37°C. Au cours de cette incubation, on procède au suivi de la survie des cellules, par mesure de la  $DO_{660}$  et la détermination du nombre de cellules viable après 1h, 2h et 3h d'incubation.

#### II.2.3.4. Test d'auto-agrégation

La technique décrite par **Rahman et al. (2008)** avec certaines modifications a été appliquée pour l'étude de l'auto-agrégation de nos souches :

Avant de réaliser ce test, le culot bactérien de chaque culture jeune (culture sur bouillon MRS incubée à 37°C/ 18h) a été récupéré après centrifugation à 5 000 trs/ 4 min, suivi d'un double lavage avec 2 ml du tampon PBS. Puis les cellules ont été suspendues dans 4 ml du tampon PBS. Le nombre de cellules viables a été ajusté à  $10^8$  / ml.

La suspension des cellules standardisée (4 ml) a été mixée par vortex pendant 10 secondes et l'auto- agrégation a été déterminée durant cinq heures d'incubation à la température ambiante (température de laboratoire). Chaque heure, 0.1 ml de la suspension déjà préparée a été transféré aseptiquement à un autre tube contenant 3.9 ml de tampon PBS et la DO (A) a été déterminée à 600 nm.

Le pourcentage d'auto- agrégation a été exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Auto agrégation (\%)} = 1 - [A / A_0] \times 100$$

A : représente l'absorbance au temps t = 1, 2, 3,4 et 5h

$A_0$  : l'absorbance à t = 0.

#### II.2.3.5. Teste d'hydrophobicité

L' hydrophobicité a été déterminée selon la méthode décrite par **Iyer et al. (2009)** :

Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à froid à 12000trs /5 min suivie de 2 lavages successivement dans 1,2 ml de tampon urée phosphate magnésium. La densité optique initiale de la suspension, lue à 450 nm ( $DO_{450i}$ ) a été ajustée approximativement à 1.

Ensuite 0,6 ml de xylène a été ajouté doucement à 3 ml de la suspension bactérienne puis incubée à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été vortexé pendant 2 min.

Après 15 min de repos, la phase aqueuse a été récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale ( $DO_{450f}$ ).

La différence de la densité optique a été considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculée par l'équation suivante :



$$(\%) \text{ Hydrophobicité} = [\text{DO}_{\text{initial}} - \text{DO}_{\text{finale}}] / [\text{DO}_{\text{initial}}] \times 100$$

### II.2.3.6. Adhésion au tissu épithélial

Pour faire le test de la capacité des ferments à effets probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal. La méthode de **Lin et al. (2007)** qui comporte trois étapes, a été impliquée :

**Préparation des cellules épithéliales :** Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum d'un poulet a été ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30 min pour être lavé. Par la suite, les tissus ont été repris, lavés 10 fois avec PBS puis laissés au repos à 4°C pendant 3h.

Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à  $10^{-4}$ , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement de  $5 \times 10^4$  cellules /ml.

**Préparation de ferment jeune :** Des cultures bactériennes jeunes ont été centrifugées à 60000tr / 10 min et le culot de chaque culture a été récupéré dans 2 ml de PBS suivis d'une observation microscopique (G x100). Le nombre a été ajusté approximativement à  $10^8$  cellules /ml.

**Réalisation du test :** 1ml de chaque culture a été mélangé avec 1ml de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée.

Après une incubation à 37°C pendant 40 min, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet (0,5%) pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif, si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.

### II.2.3.7. Activité inhibitrice des surnageant

Ce test a été réalisé selon la technique de diffusion des puits préconisée par **Allouch et al. (2010)**.

Les boîtes de Pétri ont été coulées et solidifiées (20ml de milieu gélose nutritive). Ce milieu gélosé, a été recouvert avec 7 ml de même milieu préalablement ensemencé avec 0,7 ml de la suspension de la souche indicatrice de dilution  $10^{-1}$ .

Des cultures bactériennes jeunes de 18 h ont été soumises à une centrifugation à 6000 trs / 10 min ensuite, les surnageants ont été filtrés sur un millipore (0.22µm). Les filtrats ainsi obtenus ont été divisés en deux volumes dont le premier est dit surnageant natif, le deuxième a été ajusté à pH 6,5 est dit surnageant neutre.

Puis des puits ont été confectionnés sur la gélose (quatre puits de diamètre de 4,5 mm) et chaque puits reçoit par la suite 50µl de surnageant de chaque ferments. L'incubation a été faite pendant

18 à 24 heures, à 37 °C en anaérobiose, afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la production de peroxyde d'hydrogène.

La lecture de l'activité inhibitrice de chaque surnageant a été faite par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm.

### **II.2.3.8. Activité antagonistique des ferments thermophiles**

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches de références. La méthode décrite par **Allouch et al. (2010)** a été appliquée.

On applique la même technique déjà décrite lors de l'étude de l'activité inhibitrice des surnageant (**II.2.4.7**), sauf que les puits ont été remplacés par des disques de papier Wattman stérile imbibé par 50µl de cultures de chaque ferments.

## **II.2.4. Encapsulation des ferments thermophiles locaux et industriels**

### **II .2.4.1. Procédure de micro-encapsulation**

La technique d'extrusion a été utilisée pour la micro encapsulation des ferments tel que décrit par **Mirzaei. (2012)**.

Les ferments ont été cultivées dans le bouillon MRS à 37°C pendant 18h puis les cellules sont recueillies par centrifugation (4000trs / 3 min), le poids du culot a été pesé avant de le laver une fois avec de l'eau physiologique stérile et suspendu dans 2 ml de l'eau physiologie stérile. 1ml de chaque suspension bactérienne a été mélangé avec 9 ml d'une suspension de l'alginate de sodium à 1,5 %. Le mélange ainsi obtenu a été introduit dans une seringue stérile

La gélification est faite comme suit : la suspension a été coulé en goutte à goutte dans la solution de coagulation CaCl<sub>2</sub> (0,05 M) préalablement refroidie ; avec un comptage des billes ; les billes formées étaient ensuite laissées 30 min sous une agitation douce afin de compléter l'échange ionique Na<sup>++</sup> - Ca<sup>++</sup>, toutes ces opérations étaient réalisées aseptiquement.

Les billes ainsi obtenues étaient alors lavées 02 fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer l'excès de calcium.

### **II.2.4.2. Estimation de nombre moyen de cellules dans chaque capsule**

**Confirmation de la réussite de la micro-encapsulation** : Pour confirmer la réussite du procédé de micro-encapsulation, et que chaque bile contient un nombre de cellule, on a réalisé une coupe fine d'une capsule prélevée au hasard et coloré par le violet de gentiane.

**Estimation de nombre de cellules par capsule** : Pour cette estimation, on a prélevé une capsule au hasard. Après la lyse dans le tampon phosphate, et à partir de cette solution, on a réalisé des micro-dilutions. Le nombre de cellule a été estimé par usage de la cellule de Mallassez.

### **II.2.4.3. Etude des aptitudes technologiques des ferments locales et industriel encapsulés dans une matrice alimentaire**

#### **II.2.4.3.1 .Pouvoir acidifiant**

Pour la mesure de pH des milieux contenant le micro-organisme encapsulé, un pH mètre a été employé. L'évaluation d'acidité a été mesurée par la méthode de titration en utilisant du NaOH (0,1N) (Buenol et *al.*, 2010).

Le pH et l'acidité ont été déterminés selon les mêmes techniques déjà décrit en **II.2.2.1** mais on a utilisé 5 biles pour ensemençé le lait écrémé.

#### **II.2.4.3.2. Pouvoir protéolytique**

**Sur bouillon YMA :** Pour mètre en évidence cette activité, le bouillon YMA a été ensemençé par 05 biles de chaque ferment. La protéolyse a été révélée par une clarification du milieu après une incubation à 37°C pendant 48h.

**Sur le bouillon MRS au lait écrémé :** Pour la détection de cette activité, le bouillon MRS additionnée de lait écrémé à 10% a été ensemençé par 05 biles pour chaque ferment suivis d'une incubation à 37°C pendant 48h. La protéolyse a été révélée par une clarification du milieu.

#### **II.2.4.3.3. Pouvoir texturant**

La même technique décrite en **II.2.3.5** a été appliquée avec les ferments encapsulés.

### **II.2.4.4. Etude des aptitudes probiotiques des ferments locaux et industriels encapsulés**

Pour l'étude de la résistance des ferments encapsulés à l'acidité, aux sels biliaries et au stimulus stomaco – duodéнал, nous avons appliqué les mêmes techniques décrites avec les ferments libres.

*Partie III :*

*Résultats et Discussion*

### III. Résultats et Discussion

#### III.1. Revivification des souches et rapport de *St. thermophilus* / *Lb. bulgaricus* (*St* / *Lb*)

La coloration de Gram, a montré la présence de deux types de bactéries à Gram positif. Ces bactéries, sont des bacilles droits et des coques.

Les résultats du dénombrement des cellules de chaque ferment sont groupés dans le tableau 02. Ces résultats définissent le rapport entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

**Tableau 02 :** Résultats de dénombrement des cellules des quatre ferments

Les ferments	Nombre de cellules x10 <sup>7</sup> /ml	
	<i>St. thermophilus</i>	<i>Lb. Bulgaricus</i>
<b>I1</b>	24	15
<b>I2</b>	20	18
<b>F1</b>	33	05
<b>F2</b>	46	07

Les résultats obtenus montrent que le nombre de *Lb. bulgaricus* des ferments industriels est strictement supérieur à celui des ferments locaux. Ces résultats, nous ont poussés à séparer et purifier les souches de nos ferments locaux afin de se rapprocher du rapport *St/Lb* des ferments industriels.

Après la confirmation de la pureté de chaque souche, on a dénombré les cellules viables de chaque ferment individuel (usage d'une cellule de Malassez). Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 03.

**Tableau 03:** Nombre de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* après la purification.

Les ferments	Nombre de cellules x10 <sup>7</sup> /ml	
	<i>St. thermophilus</i>	<i>Lb. Bulgaricus</i>
<b>F1</b>	14	11
<b>F2</b>	13	10

Pour se rapprocher du rapport *St/Lb* des ferments industriels, on a mélangé 1,5 ml de la culture de *St. thermophilus* avec 1ml de la culture de *Lb. bulgaricus* dans 5 ml de bouillon MRS, c'est un rapport idéal pour la reconstitution des ferments mixtes locaux (**F1**, **F2**). Cette mixture est l'équivalent de 2,5 ml de chaque ferment industriel (**I1**, **I2**) dans 5 ml de bouillon MRS.

Les ferments ainsi reconstitués vont servir pour le reste des tests.

### III.2. Etude comparative des aptitudes technologiques des ferments thermophiles locaux et industriels

#### III.2.1. Pouvoir acidifiant

Les résultats de la production d'acide lactique sont illustrés par la figure 04. L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Les résultats de ce test montrent qu'il y a une augmentation progressive de la production de l'acide lactique par les ferments locaux et industriels. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Après 2h d'incubation, les valeurs de pH varient entre pH 6.38 et 6.62, en parallèle la quantité de l'acide lactique produit se situe entre 2,70 et 3,15 g d'acide lactique par litre de lait.

Au bout de 42 h d'incubation, ces valeurs de pH diminuent et se trouvent situées entre pH 4.43 et 5.12, de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre 7,5g/l et 12,5 g/l.

On remarque que le ferment F2 possède une forte activité acidifiante, dont la concentration d'acide lactique est de 12,5 g/l, alors que les ferments industriels I1, I2 et F1 produisent une quantité respective en acide lactique de 8.17g/l, 9.9 g/l et 7,5 g/l.

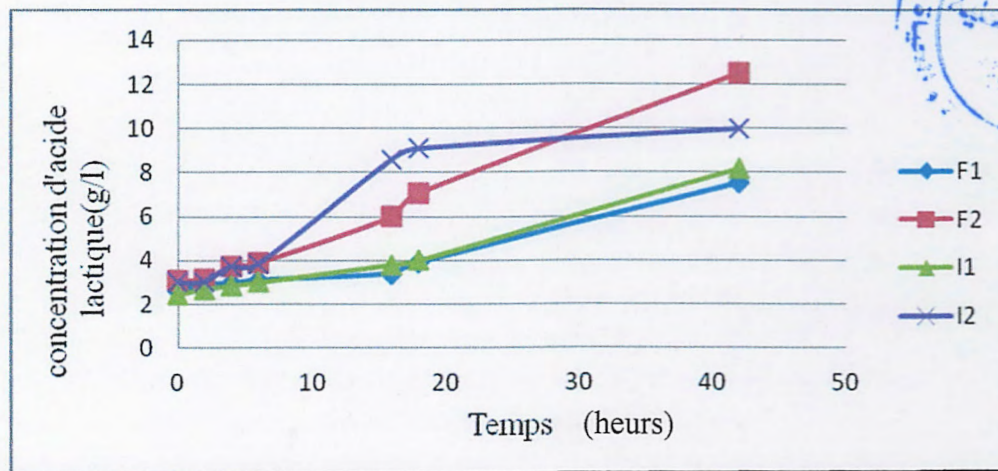


Figure 04 : Evolution d'acide lactique produit par les ferments.

Il est remarquable qu'il y a une différence entre le pouvoir acidifiant des ferments mis au test dont le ferment F<sub>2</sub> a donné les meilleurs résultats. Ces résultats se concordent et ceux de **Luquet et Corrieu (2005)** qui ont rapporté que l'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches qu'ils ont testé sur le lait écrémé a montré une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches de même espèce.

**Soustre (2009)** a rapporté que la vitesse d'acidification est l'un des critères importants dans la sélection des souches rapidement acidifiantes dont l'abaissement du pH inhibe la croissance de la plupart des germes non-lactiques.

### III.2.2. Pouvoir protéolytique

**Protéolyse sur milieu YMA :** Nos résultats ont montré une croissance avec protéolyse de tous les ferments. Les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 2 et 2,9 cm (Tableau 04).

Il apparaît que le ferment **I1** est fortement protéolytique dont le diamètre de la zone de protéolyse était de 2.9 cm.

**Tableau 04 :** Activité protéolytique des ferments étudiés sur milieu YAM.

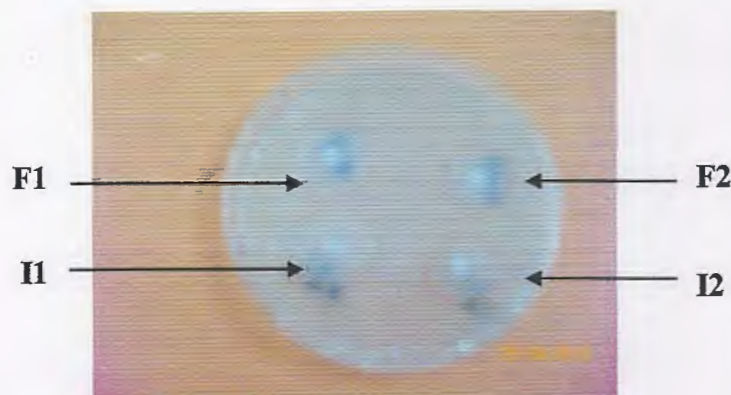
Les ferments	Diamètre des zones de protéolyse (cm)
<b>F1</b> : <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>	2,5
<b>F2</b> : <i>St. salivarius ssp thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>	2,0
<b>I1</b> : Ferment industriel de type I	2,9
<b>I2</b> : Ferment industriel de type II	2,3

Selon **Vuillemerd (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de protéolyse de diamètre, compris entre 5 et 15 mm, par comparaison à cette donnée, nos ferments sont fortement protéolytiques.

A travers cette étude, on a démontré que les ferments locaux présentent les mêmes aptitudes protéolytiques que ceux industriels.

Ces résultats son accord avec ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel, présentaient un caractère protéolytique.

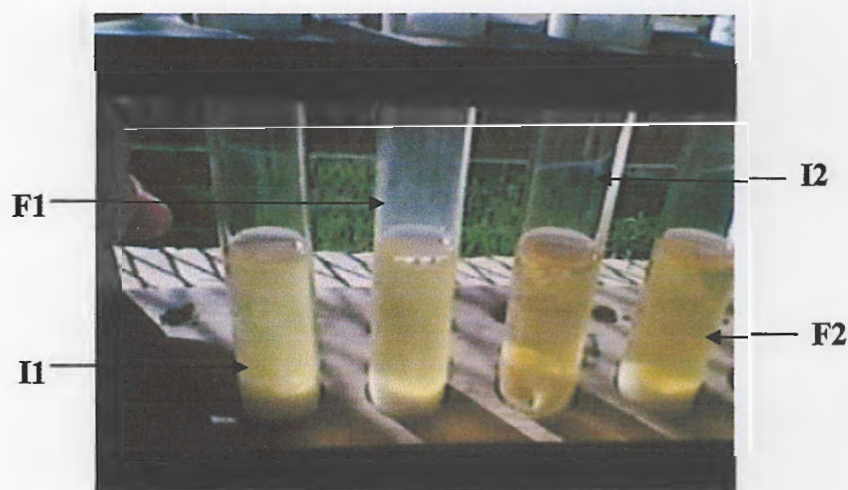
La photo 01 montre des zones de protéolyse sous forme d'halo bien clair.



**Photo 01:** Activité protéolytique des ferments sur milieu YMA.

**Protéolyse sur bouillon nutritif :** Après incubation, on a noté la présence d'un précipité au fond de chaque tube avec une clarification des cultures qui traduit la dégradation de la caséine du lait, cette précipitation diffère d'un ferment à un autre (Photo 02).

On remarque que la culture des ferments F2 et I2 donne une bonne précipitation des caséines avec une clarification nette du milieu, ce qui témoigne une forte activité protéolytique.



**Photo 02 :** Activité protéolytique des ferments lactiques sur bouillon nutritif.

**Protéolyse sur le milieu A/B :** L'activité protéolytique des ferments sur le milieu A/B a montré qu'il y a des zones de protéolyse autour des puits, où le diamètre des zones est compris entre 1,9 à 4,1cm (tableau 05).

Cependant, les ferments industriels ont une forte activité protéolytique comparativement aux ferments locaux.

**Tableau 05 :** Activité protéolytique des ferments lactiques sur le milieu A/B.

Ferments	Diamètre de la zone de protéolyse (cm)
F1: <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	1,9
F2: <i>St. salivarius</i> ssp <i>thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	2,9
I1: Ferment industriel de type I	3,4
I2 : Ferment industriel de type II	4,1

Ces résultats montrent que nos ferments locaux sont dotés d'une des propriétés technologiques, qui est l'un de critères de sélection de culture destinées à la production de fromages et de yaourt.



D'après Leveau et al. (1991), l'aptitude protéolytique est liée à la présence de gène codant pour cette activité car quelques propriétés technologiques des bactéries lactiques sont portées par les plasmides. Elle est recherchée pour l'amélioration de la qualité organoleptique de l'aliment surtout le fromage et le yaourt.

Le ferment F2 a montré de zone de protéolyse sous forme d'halo bien clair comparativement aux des restes, ce dernier possède une forte pouvoir protéolytique, presque comparable à celle du ferment industriel I2.

La photo ci-dessous, illustre l'activité protéolytique des ferments locaux et industriels dont les zones de protéolyses apparaissent clairement autour des disques.

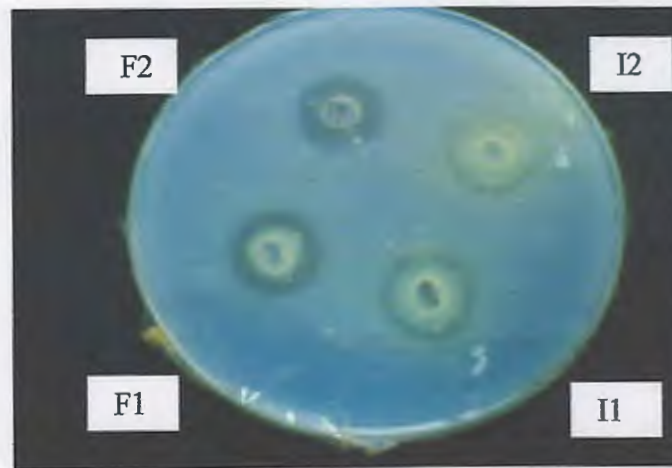


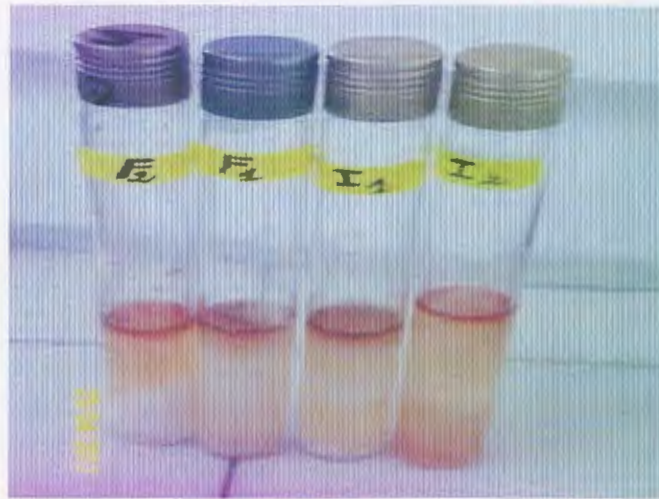
Photo 03 : Pouvoir protéolytique des ferments lactiques sur le milieu A/B.

### III.2.3. Aptitudes aromatisant et lipolytique

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante des produits laitiers fermentés donc les souches productrices sont importantes pour contribuer aux caractéristiques organoleptiques du produit fini.

Les résultats obtenus sont illustrés par la photo 04, le test positif se traduit par la présence d'anneau rouge dans tous les tubes. Il apparait que les ferments arrivent à produire des arômes.





**Photo 04 :** Pouvoir aromatisant des ferments thermophiles locaux et industriels.

Divers composé aromatique interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt, c'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés. Parmi ceux-ci, l'acide lactique qui donne au yaourt le goût acidulé (Hansen, 2011).

De nombreux auteurs ont montré que l' $\alpha$ -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne (Monnet et al., 2008).

Les résultats de l'activité lipolytique des ferments lactiques sont négatif, il apparait que tous les ferments lactiques ne présente pas une activité lipolytique, l'absence de la production de lipase est révélée par l'absence des colonies bleu-vertes. Ce test n'est pas concluant quant à cette aptitude et il se peut que le milieu de culture utilisé est défavorable pour la production et ou l'activité des lipases.

Selon Béal et al. (2008), les propriétés lipolytiques sont généralement faible chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés plus lipolytiques que *St. thermophilus* et les lactobacilles.

Les travaux de Fernandez et al. (2000), ont montré que l'activité estérasique n'était pas nécessaire à la croissance des bactéries lactiques ni dans un milieu synthétique, ni dans du lait écrémé ou entier.

### III.2.4. Pouvoir texturant

**Pouvoir texturant sur la gélose hypersaccharosé :** Les résultats de ce test sont positifs pour tous les ferments à l'exception du ferment industriel II. Cette activité s'est traduite par l'apparition de colonies larges et gluantes avec aspect brillant sur la gélose hypersaccharosé (Photo 05).

L'apparition de ce type de colonies est liée à la production d'un exopolysaccharide dans le milieu.



**Photo 05 :** Pouvoir texturant des ferments sur milieu hypersaccharosé.

Selon **Sodini. (2004)**, les propriétés texturants des bactéries lactiques sont principalement utilisées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés.

Ainsi, la production d'exopolysaccharides par les bactéries lors de leur développement dans le lait, évite d'augmenter le taux protéiques du produit ou d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que les texturants et les épaississants, lors de la production de yaourt (**Palomares, 2007**).

**Pouvoir texturant sur bouillon hypersaccharosé :** La courbe d'étalonnage du glucose (**Annexe III**) a été utilisée afin de déterminer la quantité du glucose libérée par les ferments locaux et industriels.

Les résultats de ce test sont groupés dans le tableau 06. L'analyse de ces derniers montre que tous les ferments possèdent un pouvoir texturant avec une production d'une quantité variable d'exopolysaccharide.

Le ferment le plus performant est celui codé **F2**, qui arrive à produire 0,894 g de glucose /l. Ceux industriels codés **I1** et **I2**, produisent respectivement 0.834 et 0.745 g de glucose /l.

**Tableau 06:** Quantité du glucose libérée par les ferments locaux et industriels.

Les ferments	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
DO <sub>490</sub>	0,564	0,714	0,668	0,600
Concentration du glucose (g/l)	0,635	0,894	0,834	0,745

Nos résultats se concordent et ceux de **Mende et al. (2011)**, qui a rapporté que certains *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sont capables de synthétiser des exopolysaccharides et sont donc très important pour l'industrie laitière comme des cultures starter. Mais il a mentionné également que les exopolysaccharides peuvent altérer les propriétés technofonctionnel (la viscosité ou de liaison d'eau) des aliments fermentés comme le yogourt.

Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse (**Cerning, 1990**).

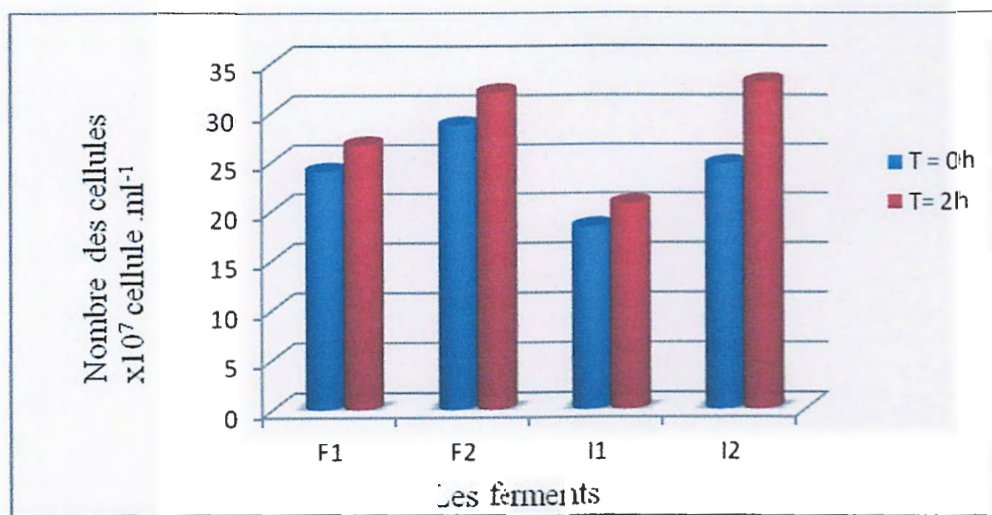
### III.3. Aptitude probiotiques des ferments

#### III.3.1. Tolérance des ferments à l'acidité

L'étude de l'exposition prolongée des ferments locaux et industriels aux conditions acides similaires à celles de l'estomac a été réalisée par incubation dans le milieu MRS à différents pH pendant 2 h.

Les résultats obtenus, illustrés par la figure 05 montrent une bonne viabilité pour tous les ferments dans le milieu MRS à pH 6,5. L'analyse de cette figure montre l'existence d'une viabilité continue des ferments locaux et industriels sur ce milieu.

De même, le taux de survie chez tous les ferments locaux et industriels est important. Le ferment local **F2** et l'industriel **I2** ont donné une bonne croissance après 2 h d'incubation et le nombre de cellule dépasse 31.5 et 33x10<sup>7</sup> cellules/ml respectivement.



**Figure 05 :** Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 6,5.

Cependant les résultats de l'effet du milieu pH 2,5 sur la viabilité des ferments (Figure 06) ont montré que les ferments possèdent une tolérance variable aux acides. L'analyse de cette figure, montre une baisse de la croissance du ferment locale **F1** et industriel **I2** après 2h d'incubation.

Cependant, on trouve que le ferment **F2** présente une meilleure résistance, car il donne une croissance après 2 h d'incubation qui est reflétée par une augmentation du nombre de cellules (30,5 x 10<sup>7</sup> cellules /ml).

Donc, le ferment locale **F2** composé de *St. salivarius* ssp *thermophilus* et *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* est le plus tolérant aux conditions acides.

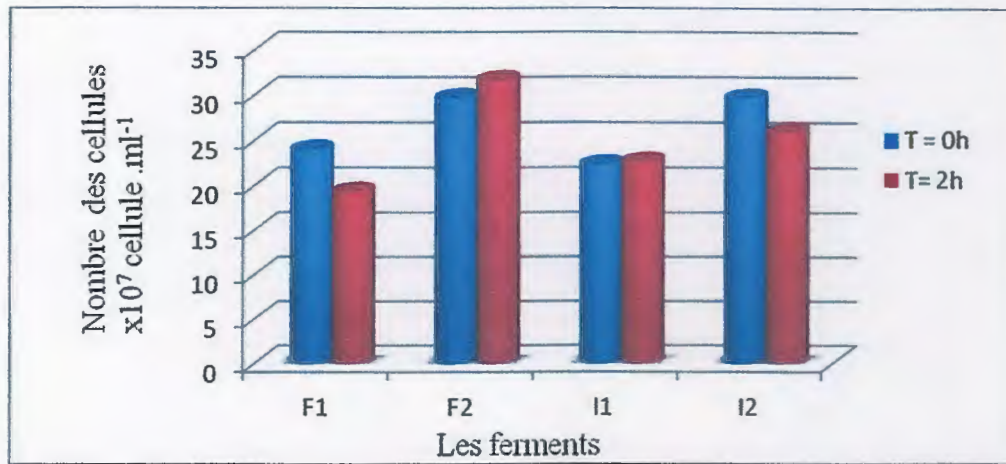


Figure 06 : Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 2,5.

Contrairement à ce qui a été obtenu avec le milieu MRS pH2.5, les résultats de la figure 07 révèlent qu'il y a une croissance des ferments sur le milieu MRS pH 2 dont le nombre de cellules témoigne une résistance couplée à une croissance. De ce fait les résultats illustrés par la figure 06, peuvent être soumis à une critique scientifique et peuvent être liés à une erreur de dénombrement des cellules.

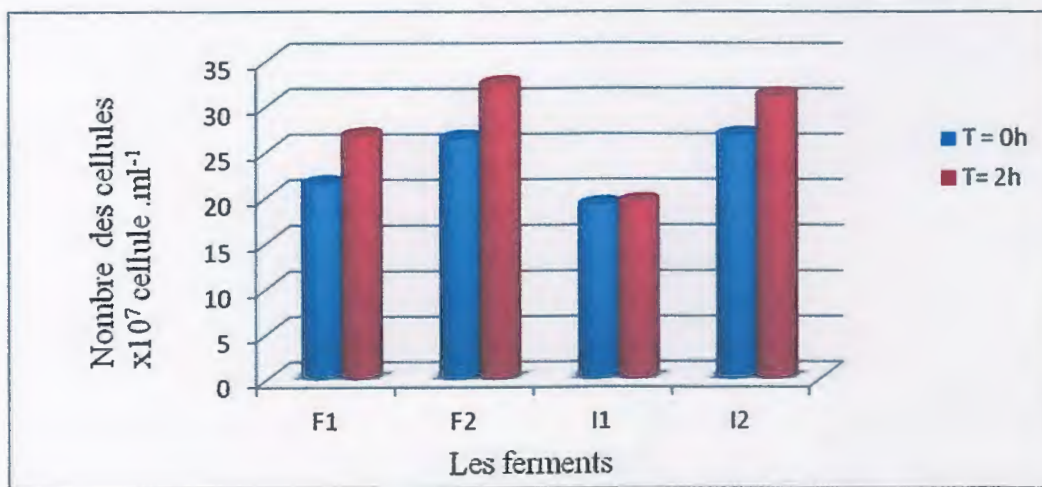


Figure 07 : Croissance des ferments locaux et industriels sur le milieu MRS pH 2.

De l'ensemble des résultats obtenus par les figures 05, 06 et 07, on a constaté que le ferment **F2** (*St.salivarius ssp thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*) est le plus tolérant aux conditions hostiles acides. Des résultats similaires ont été trouvés par **Dib et al. (2012)**.

Une des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotique est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité simulant celles du jus gastrique ; ce dernier pouvant varier entre pH 1 et pH 4.5 à la suite d'un repas.

D'autre part, les travaux de **Mathara et al. (2008)** ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus* sp. vis-à-vis des milieux pH 2,5 et pH 2 après 2 h d'incubation.

Selon **Gu et al. (2008)**, les propriétés désirables des bactéries probiotiques peuvent inclure

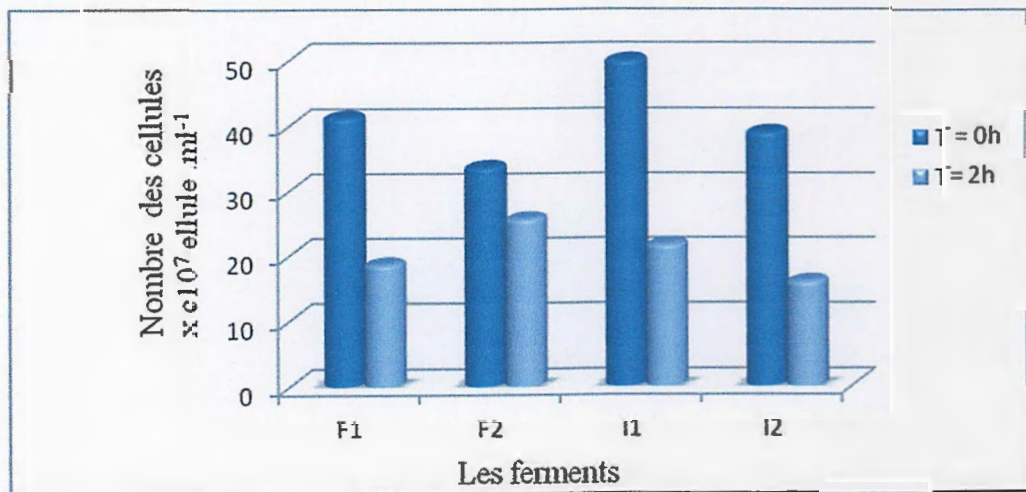
leur capacité de résistance aux pH acides. D'autre part, pour que les bactéries probiotiques exercent des effets bénéfiques dans le tractus-intestinal, ils doivent survivre lors du passage à travers l'estomac.

### III.3.2. La résistance aux sels biliaries

Après une incubation à 37°C pendant 2 heures, la croissance bactérienne a été évaluée par la mesure de la densité optique et le dénombrement des cellules.

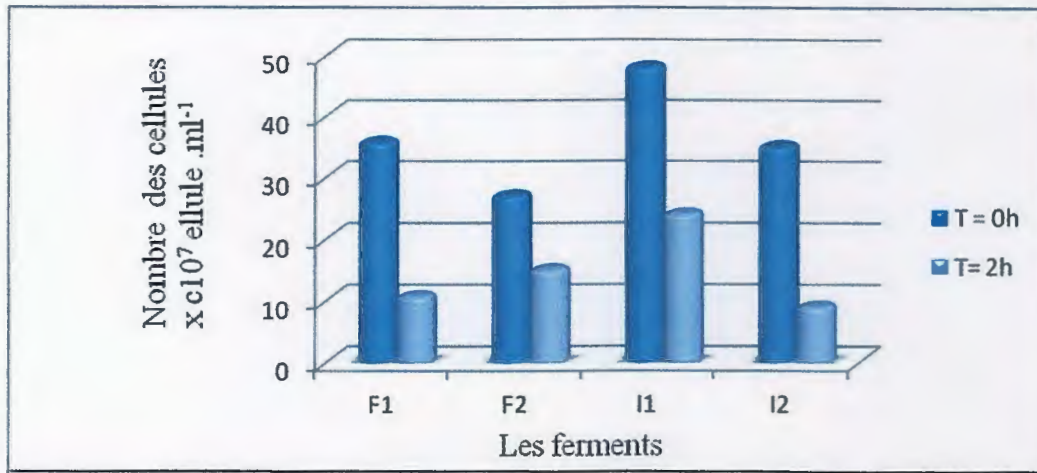
Les résultats ont montré une sensibilité des ferments aux sels biliaries à pH 6,5 avec un taux de réduction considérable et variable.

D'après les résultats illustrés par la figure 08, il apparaît que le nombre de cellules viable du ferment **F2** reste important malgré qu'il y a une perte de croissance où le taux de réduction a été estimé à 24,25% par contre le reste des ferments **F1**, **I1** et **I2**, ont montré une faible tolérance de survie dont le taux de réduction en nombre de cellules était respectivement de 54,88%, 57% et 59%.



**Figure 08 :** Tolérance des ferments locaux et industriels aux sels biliaries à pH 6,5.

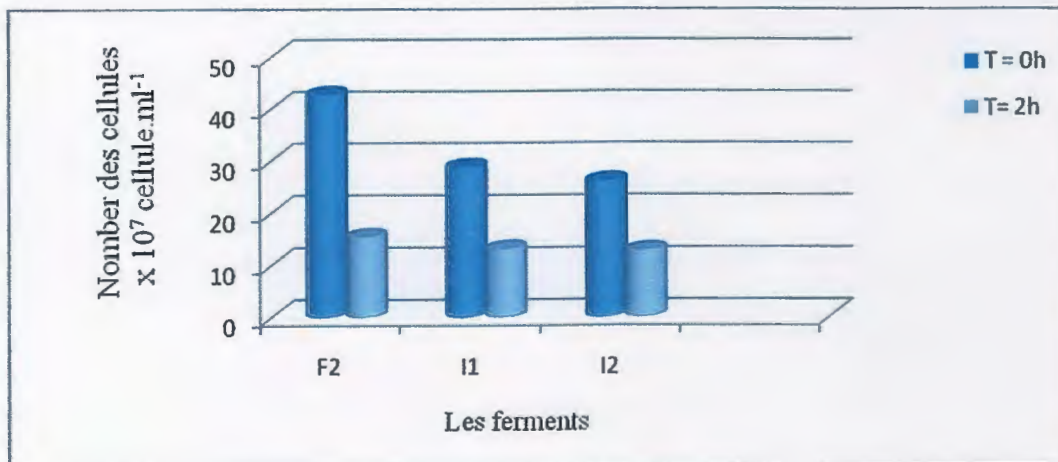
Cependant les résultats de la figure 09 montrent une réduction de nombre de cellules des ferments sur le milieu MRS pH2, 5 après 2h d'incubation. On constate que la perte en nombre de cellules (perte de croissance) sur ce milieu était respectivement de 44,42% et 50% pour les ferments **F2** et **I1** alors que pour les ferments **F1** et **I2**, elle était considérable estimée à 70,10% et 60,19% respectivement.



**Figure 09:** Tolérance des ferments locaux et industriels aux sels biliaries à pH 2,5.

Les résultats de la croissance en présence de sel biliaire sur milieu à pH 2 illustrés par la figure 10, montrent une réduction en nombre de cellules pour tous les ferments avec un taux de réduction variable.

De façon générale, il est bien établi que malgré qu'il y à eu une perte de la croissance de l'ensemble des ferments lactiques à pH acide, le nombre de cellules viables reste important donc, ils peuvent résister ultérieurement aux conditions acide de l'estomac particulièrement le ferment F1 qui présente une meilleure tolérance, il arrive dans ce type de situation de maintenir sa croissance sur un milieu défavorable dans le cas de pH2 quand le taux de croissance est de 89,83%.



**Figure 10 :** Tolérance des ferments locaux et industriels aux sels biliaries à pH 2.

Les résultats des études menées par Krasaeoopt et al. (2003) et Drouault et Corthier (2001), ont montré que *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* et *St. thermophilus* se développer mal dans le tractus intestinal en raison de leurs faibles tolérance aux sels biliaries, car les sels biliaries auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires résultant en une

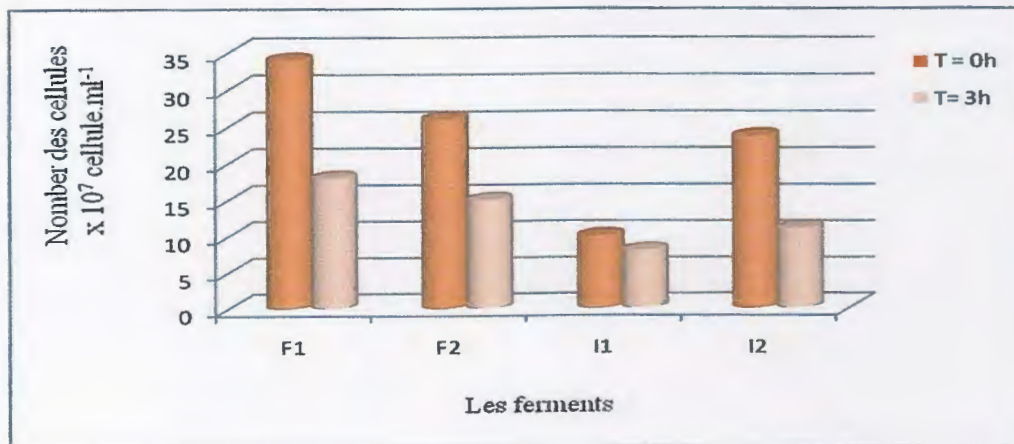
augmentation de la perméabilité cellulaire. De même **Zago et al. (2011)** ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage.

Il a notamment été montré *in vivo* que la présence de lait augmente la résistance des probiotiques à l'acidité gastrique entre 40 et 60 min dans l'estomac sans addition de lait et jusqu'à 2 h quand du lait est ajouté. La survie de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* est également plus importante lorsqu'ils sont ingérés dans du yaourt (**Drouault et Corthier, 2001**).

### III.3.3. Réponse au stimulus stomaco – duodéal

Les résultats de l'expérience ont montré un abaissement de la croissance des ferments locaux et industriels aux composés similaires à ceux sécrétés *in vivo*, à l'exception du ferment **I1** où on a noté une faible réduction de la croissance (Figure 11).

Après l'ajout des sécrétions duodénales synthétique au milieu, le comportement des ferments était variable. Nous avons noté une réduction du nombre de cellule des ferments **F1**, **F2** et **I2** durant les trois heures d'incubation.



**Figure 11:** Réponse des ferments locaux et industriels au stimulus stomaco– duodéal.

La tolérance au faible pH ne suffit pas pour prédire la survie d'une souche lors de son passage à travers l'appareil digestif, dans les conditions d'estomac, l'étude de la tolérance à la bile et le suc pancréatique est aussi important pendant une période donnée. Le temps de transit peut être variable de 1h, 3h et 4 h selon l'individu, l'alimentation et autre condition, cela peut influencé la viabilité des bactéries probiotiques (**Vizoso Pinton et al., 2006**).

L'étude conduite par **Vizoso Pinton et al. (2006)** sur trente cinq souches de *Lb. sp.* a révélé la tolérance de sept souches au stimulus stomaco-duodéal avec une survie qui varie entre 11% et 93 %.



### III.3.4. Adhésion au tissu épithélial

Comme l'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales *in vivo* est difficile à réaliser, l'adhésion *in vitro* est le modèle le plus utilisé (Gu et al., 2008).

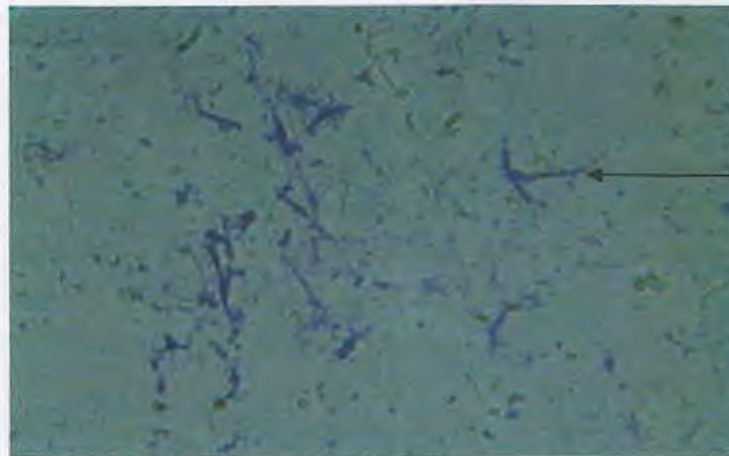
Dans notre étude, nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales d'iléum du poulet). Les résultats de ce test ont montré que tous les ferments possèdent cette propriété probiotique (Tableau 07).

Cependant, il apparaît que les deux ferments **F2** et **I2** présentent une excellente adhésion aux cellules épithéliales de l'iléum du poulet, caractérisées par un nombre assez important de bacilles et coques fixées sur les cellules épithéliales. Tandis que les ferments **F1** et **I1** ont présenté une adhésion modérée.

**Tableau 07:** Adhésion des ferments locaux et industriels aux cellules épithéliales du poulet.

Ferments	Pouvoir adhésif
<b>F1:</b> <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>	+
<b>F2:</b> <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>	++
<b>I1:</b> Ferment industriel de type I	+
<b>I2:</b> Ferment industriel de type II	++
(+): bonne adhésion                      (++) : Excellente adhésion	

La photo ci-dessous, illustre la capacité des bactéries du ferment **F2** à adhérer aux cellules épithéliales (photo6).



Amas des bactéries

**Photo 06:** Adhésion des cellules du ferment **F2** aux cellules épithéliales.

Selon Palomares et al. (2007), l'une des propriétés désirables des bactéries probiotiques est l'adhésion aux cellules épithéliales, cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries pathogènes et la stimulation du système immunitaire.

D'après certains auteurs, l'origine de probiotique joue un rôle dans les capacités d'adhérence et il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent adhérer mieux aux mucus intestinal de l'homme (Gu et al., 2008).

### III.3.5. Test d'auto agrégation

Ce test permet d'évaluer le taux d'auto-agrégation entre les souches du même ferment. La courbe ci-dessous illustre les résultats obtenus au cours de la phase d'incubation des quatre ferments.

Après une heure d'incubation, les taux d'auto-agrégation varient entre 2,15 et 78,01%. Les valeurs après 2 heure atteignent 73%, 75.62% et 76.51% respectivement pour les ferments F1, I1 et I2. Cependant, on remarque que le ferment local F2 à un meilleur taux d'auto-agrégation (87.92%).

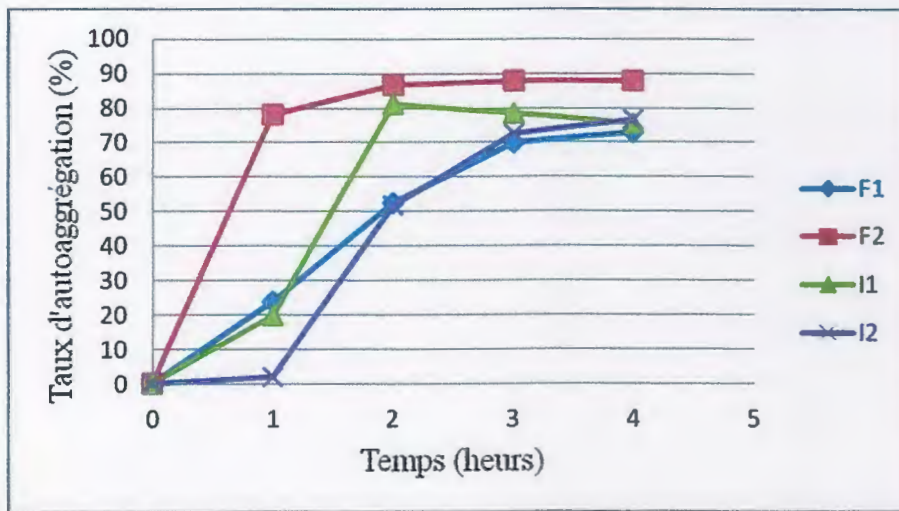
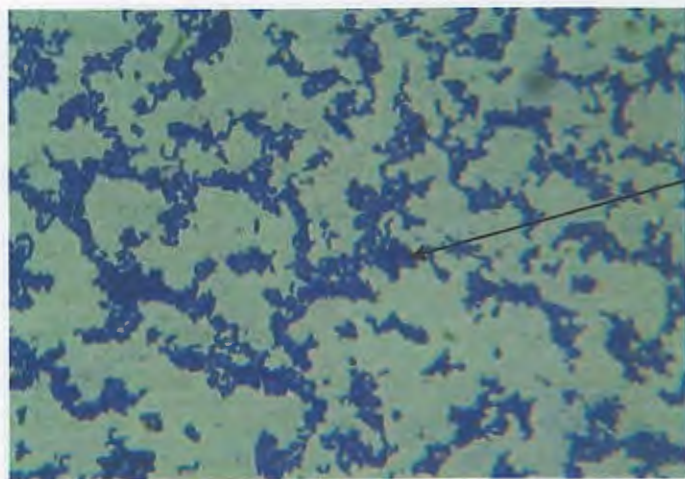


Figure 12: Résultats d'auto-agrégation des ferments locaux et industriels.

La souche auto-agrégée a formé un précipité avec une solution claire dont l'observation microscopique a révélé des amas de cellules groupés en masse (Photo 07).



Amas des bactéries

Photo 07 : Résultat d'auto-agrégation du ferment F2.

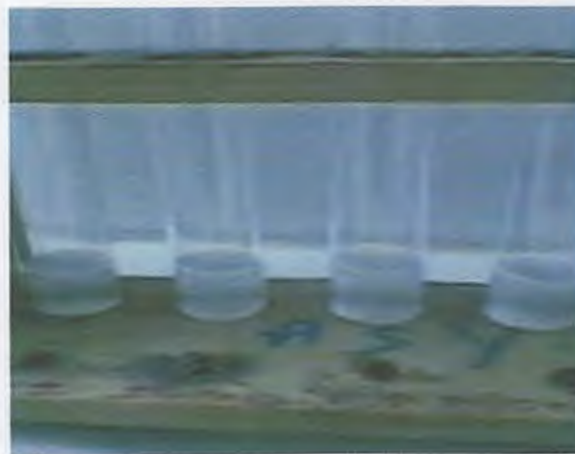
### III.3.6. Test d'hydrophobicité

Le tableau 07 montre les résultats de ce test d'hydrophobicité pour tous les ferments. Ces résultats montrent que les ferments **F2**, **I1** et **I2** présentent une hydrophobicité considérable estimée à 39,61%, 40,23% et 67,75% respectivement. En revanche, le ferment **F1**, présente une faible hydrophobicité (21%).

La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les ferments et l'hydrocarbure. Les pourcentages obtenus de l'adhérence des ferments au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface.

**Tableau 08** : Résultats de l'hydrophobicité des ferments locaux et industriels vis-à-vis du xylène.

Ferments	DO <sub>450</sub> initiale	DO <sub>450</sub> finale	Hydrophobicité (%)
<b>F1</b>	0,986	0,775	21%
<b>F2</b>	1,05	0,634	39,61%
<b>I1</b>	0,952	0,568	40,23%
<b>I2</b>	1,045	0,337	67,75%



**Photo 08** : Hydrophobicité des ferments locaux et industriels vis-à-vis du xylène.

Selon **Kos et al. (2003)**, la diminution de l'hydrophobicité de surface peut être due à l'augmentation de répulsion électrostatique. Il a été rapporté que lors du dosage hydrophobicité de la surface, les hydrocarbures utilisés sont chargés négativement et les cellules bactériennes ont une charge négative.

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Roos et Jonsson, 2002**).

### III .3.7. Activité inhibitrice des surnageant natifs et neutres

Selon Schillinger et al. (2005), l'inhibition est notée positive lorsque la zone d'inhibition est supérieure à 1 mm.

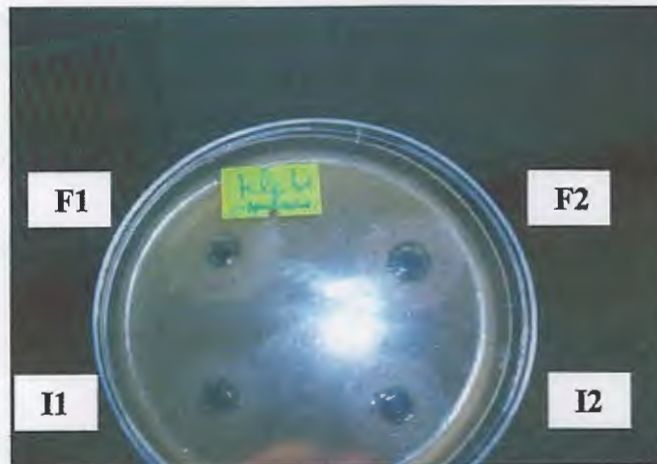
**Effet des surnageants natifs :** Les surnageants natifs des différents ferments sélectionnés, présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis des germes cibles testés. Les résultats de l'interaction obtenue révèlent la présence des zones d'inhibition claires avec des bordures bien distinctes, le diamètre d'inhibition varis entre 1 et 3 cm suivant la souche testée (Tableau 09).

D'après les résultats obtenus, on remarque que la plus large zone d'inhibition est obtenue avec le surnageant du ferment **F2** à l'encontre de *E.coli* et *Bacillus subtilis* dont la zone d'inhibition était de 3 cm.

**Tableau 09 :** Résultat de l'activité inhibitrice des surnageant natifs (cm).

Ferments	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>F1</b>	2,4	1,1	2,5	1,3	1,5
<b>F2</b>	3	1	3	2,2	2,4
<b>I1</b>	2,6	1,3	2,6	1,2	1,2
<b>I2</b>	2,9	1,1	2,6	2	2

La photo 09, permet d'apprécier les zones d'inhibitions obtenue à l'égard de *Klebsiella* sp.



**Photo 09 :** Résultat de l'effet du surnageant natifs des ferments étudiés vis-vis de *Klebsiella* sp.

**Ammor et Mayo. (2006)** ont montré que la capacité inhibitrice *in vitro* des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaire.

Il a été démontré que les acides organiques peuvent exercer une action inhibitrice spécifique, et d'autre part, l'activité inhibitrice de nombreux autres agents à savoir le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le CO<sub>2</sub>, les antibiotiques et les bactériocines a été également mise en évidence (Kos et al., 2003).

**Effet des surnageants neutres :** Les résultats du tableau 10 montrent que seuls les surnageants des ferments **F2** et **I1** arrivent à inhiber la croissance de *Bacillus subtilis*. On remarque aussi que *Bacillus subtilis* a été plus sensible au surnageant **F2** qui s'est traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de 2,5 cm de diamètre.

**Tableau 10 :** Résultat de l'activité inhibitrice des surnageants neutres (cm).

Ferments	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i> <i>sp</i>	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
<b>F1</b>	00	00	00	00	00
<b>F2</b>	00	00	2,5	00	00
<b>I1</b>	00	00	02	00	00
<b>I2</b>	00	00	00	00	00

L'utilisation de ferments lactiques capables de produire des substances antimicrobiennes comme les bactériocines, pourrait permettre d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments fermentés. (Baliarda, 2003).

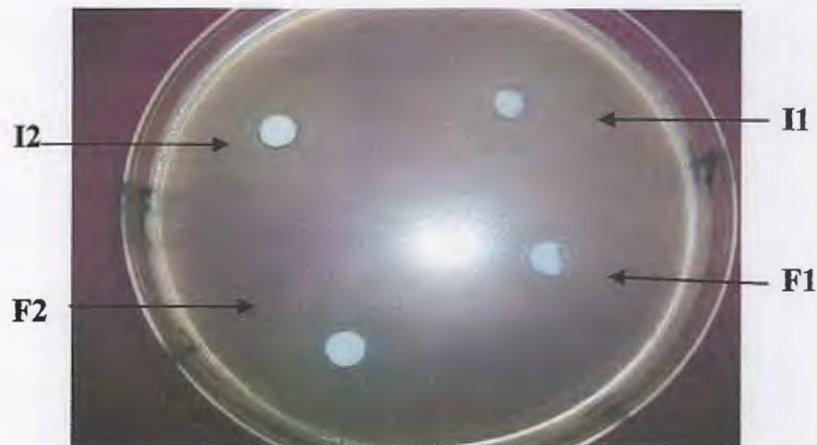
### III.3.8. Activité antagonistique

Les résultats montrent qu'il y a une nette inhibition de tous les souches testées par les cultures thermophiles, où le diamètre des zones d'inhibition était compris entre 0,6 et 2,9 cm. Le ferment locale **F2** et celui industriel de type II (**I2**) sont considérées comme étant les plus performants pour leur activité antagonistique (tableau 11).

**Tableau 11:** Résultat de l'activité antagonistique des ferments (cm).

Ferments	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i> <i>sp</i>	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
<b>F1</b>	1	1	2,3	0,6	2,1
<b>F2</b>	1,2	1,2	2,5	1	2,9
<b>I1</b>	1,2	0,9	1,9	1	2,4
<b>I2</b>	1	1	2,3	1,1	2,9

La photo ci-dessous, illustre l'activité inhibitrice des ferments locaux et industriels vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*.



**Photo 10 :** Activité antibactérienne des ferments sur *Listeria monocytogenes*.

D'après **Allouche et al. (2010)**, l'activité inhibitrice augmente progressivement au début de la phase exponentielle et se stabilise au cours de la phase stationnaire, qui correspond à la phase de synthèse des substances inhibitrices par les cellules productrices dans le milieu extracellulaire. Cette stabilité d'activité est attribuée d'une part au fait que la lyse cellulaire est incomplète au début de la fermentation.

#### **III.4. Encapsulation des ferments thermophiles locaux et industriels**

Les microcapsules probiotiques étaient de formes sphériques avec des groupes de bactéries enfermées dans les vides internes et entourés par la matrice. Le diamètre de chaque bille est en moyenne de 2,5mm (photo 11).



**Photo 11 :** Aspect des billes des ferments encapsulés.

**Nan chen et al. (2005)**, ont indiqué que la concentration de l'alginate de sodium affecte la structure des microcapsules dont des concentrations plus élevées produit une surface plus douce.

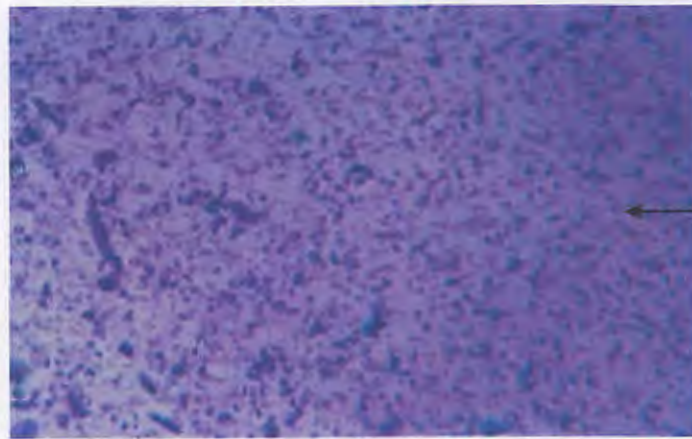
Le tableau 12 nous donne une estimation sur le nombre de cellules de chaque ferment enfermés dans les microcapsules. De ces résultats, il apparaît que les capsules renferment un bon nombre de cellule bactérienne qui en moyenne de  $28 \times 10^7$  cellules.

Selon Quintino et al. (2008), la protection du probiotiques par microencapsulation dans des capsules d'alginate est une méthode qui améliore leur viabilité en nourritures fonctionnelles. L'alginate est souvent employé comme matériel d'encapsulation parce qu'il à les avantages d'être non-toxique et d'être aisément disponible.

Tableau 12: Nombre des cellules par capsule.

Les ferments	Cellules / bille
F1	26,5 x 10 <sup>7</sup>
F2	24,0 x 10 <sup>7</sup>
I1	31,0 x 10 <sup>7</sup>
I2	30,5 x 10 <sup>7</sup>

L'observation microscopique d'une coupe fine d'une capsule colorée avec le violet de gentiane a révélé la présence des bactéries dans la matrice de l'alginate de sodium (photo 12).



← Cellules bactériennes

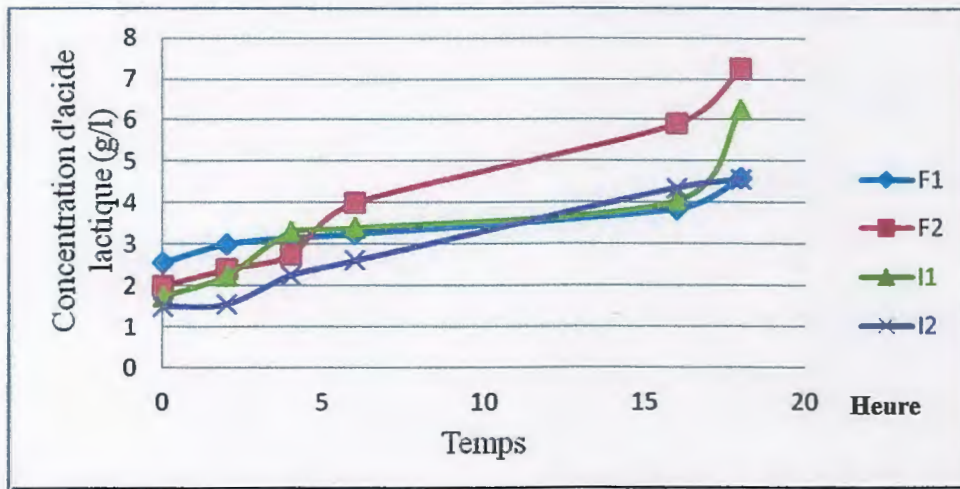
Photo 12: Photomicrographie des cellules du ferment F1 encapsulés.

Une photo semblable, d'une coupe a été rapportée par Nan Chen et al. (2005). Cependant, Hansen (2002) et Nan Chen et al. (2005), ont rapporté que la micro encapsulation avec de l'alginate de calcium peut protéger les probiotiques dans des produits alimentaires tel que le yaourt.

### III.4.1. Etude des aptitudes technologiques des ferments locales et industriels encapsulés dans une matrice alimentaire

#### III.4.1.1 .Pouvoir acidifiant

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 13. Après 18h d'incubation, les ferments locaux et industriels encapsulés produisent des quantités variables en acides lactiques qui atteignent 6.25g/l ,4.35g/l ,4 .6g/l et 7.25g/l pour les ferments F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>et I<sub>2</sub> respectivement. Cependant par comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec les ferments libre, on constate que la capsule n'entrave pas l'activité métabolique des ferments.



**Figure 13 :** Production d'acide lactique par les ferments encapsulés.

Généralement, l'acidité titrable totale a augmenté et le pH a diminué dans tous les échantillons de laitensemencés par les ferments micro-encapsulés.

#### III.4.1.2. Pouvoir protéolytique

**Protéolyse sur MSR au lait écrémé :** Sur milieu MRS au lait liquide, l'activité protéolytique des ferments locaux et industriels se manifeste par une clarification de milieu. Les résultats de ce test indiquent que tous les ferments sont protéolytiques (Photo13).



**Photo 13 :** Activité protéolytique des ferments sur MSR au lait écrémé.

Ces résultats, laissent constater que les capsules protègent les cellules mais n'empêche en aucun cas le déroulement des activités métaboliques des souches. A travers ce test, on pourra déduire que la protéolyse n'a pu être déroulée s'il n'y a pas eu de libération d'enzyme à l'extérieur de la capsule.



**Protéolyse sur milieu YMA :** Après incubation, on a observé une précipitation au fond de chaque tube avec une clarification du milieu, ce qui traduit une dégradation des protéines du lait (Photo 14).



**Photo 14 :** Activité protéolytique des ferments sur bouillon YMA.

L'introduction des cellules encapsulées probiotiques dans les yogourts ensemble, semble augmenter la survie des souches dans le produit (Krasaekoopt et al., 2003).

#### III.4.1.3. Pouvoir texturant

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 13 .L'analyse de ces derniers montre que tous les ferments encapsulés possèdent une pouvoir texturant et produisent une quantité variable d'exopolysaccharide. Cependant, le ferment le plus performant est celui industriel codé **I1** qui arrive à produire 1,66 g de glucose /l suivi des ferments locaux avec des quantités respectives de 0,928 et 0,876 g/l pour **F1** et **F2**. Par ailleurs, les ferments encapsulés ont un bon pouvoir texturant comparativement à leurs formes libres.

**Tableau 13:** Quantité du glucose libérée par les ferments locaux et industriels encapsulés.

Les ferments	F1	F2	I1	I2
DO <sub>490</sub>	0,740	0,684	0,818	0,328
Concentration du glucose (g/l)	0,928	0,876	1,660	0,460

#### III.4.2. Etude des aptitudes probiotiques des ferments locaux et industriels encapsulés

##### III.4.2.1. Résistance à l'acidité

Cette expérience a été réalisée par incubation des ferments locaux et industriels encapsulés pendant 2 h (les deux cas piégés et relarguées) dans le milieu MRS à différent pH (pH6.5, pH2.5, pH2).

D'après les résultats obtenus, il apparait clairement que les ferments piégés poussent sur le

milieu MRS pH 6,5. La meilleure croissance est celle des deux ferments encapsulés F2 et I2. Par contre relarguées, les ferments ont perdu partiellement leurs performances de croissance dont le taux de réduction atteint 23,13% pour F2. Reste à noter que seul le ferment F1 a montré une viabilité continue (Figure 14).

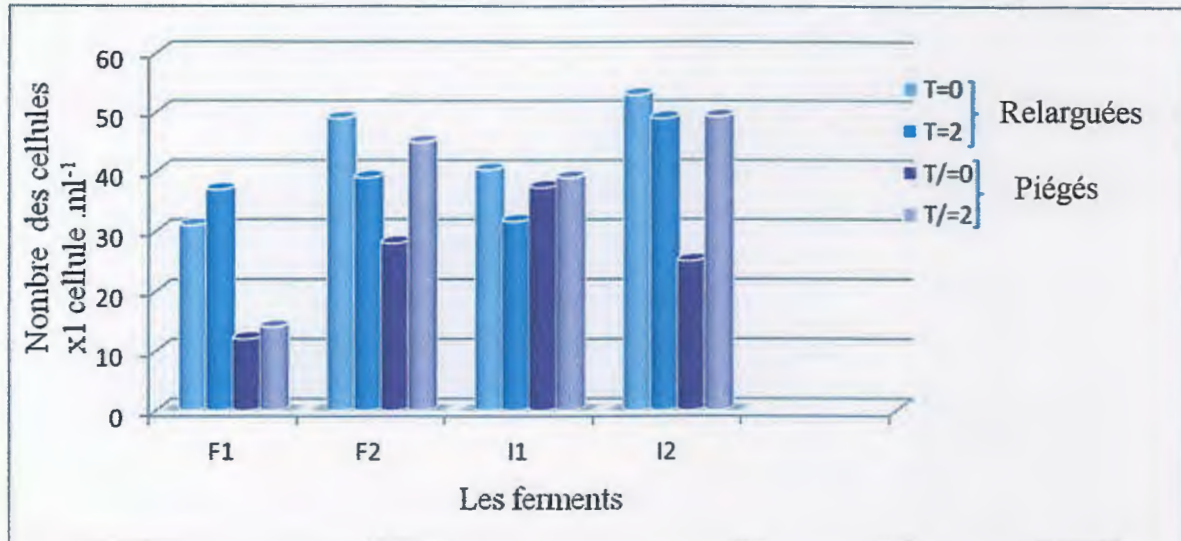


Figure 14: Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH 6,5.

Corrieu et luquet, (2008) ont rapporté que le pH du milieu influence fortement la croissance des bactéries lactiques, les valeurs de pH optimal de croissance sont généralement comprises entre 6 et 6,5 pour les *St. thermophilus* et entre 5,5 et 6 pour les Lactobacilles.

A pH 2,5 alors que le taux de viabilité a diminué chez la majorité des ferments, il a été de 60% pour les cellules relarguées. Cette valeur a été de 73,27% et de 60,87% pour F1 et I2 respectivement. Pour les cellules encapsulées piégées, une protection significative des cellules contre l'acidité est notable et le taux de viabilité était très important à pH 2.5. Il apparaît clairement que les ferments possèdent une tolérance considérable au milieu pH 2.5. On a marqué une meilleure tolérance chez les ferments locaux F1 et F2 (Figure 15).

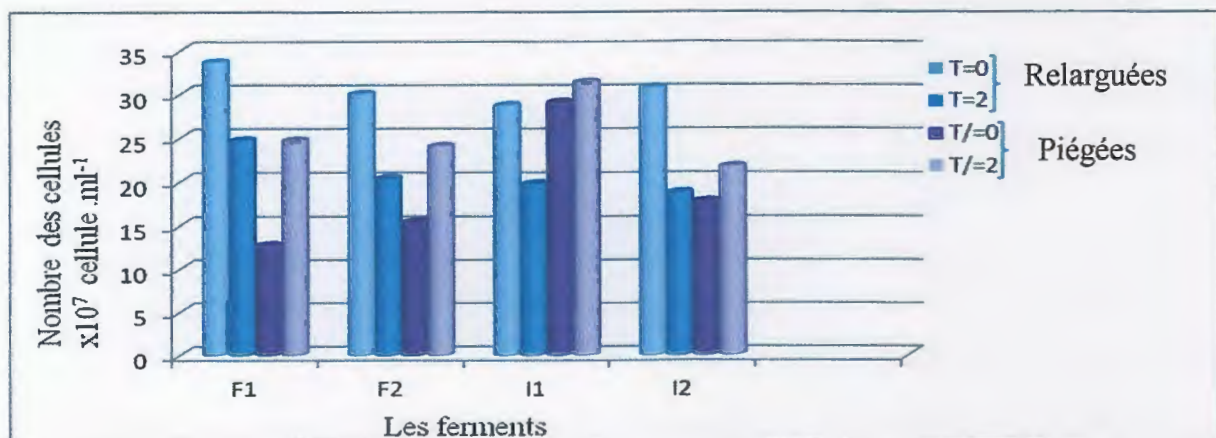
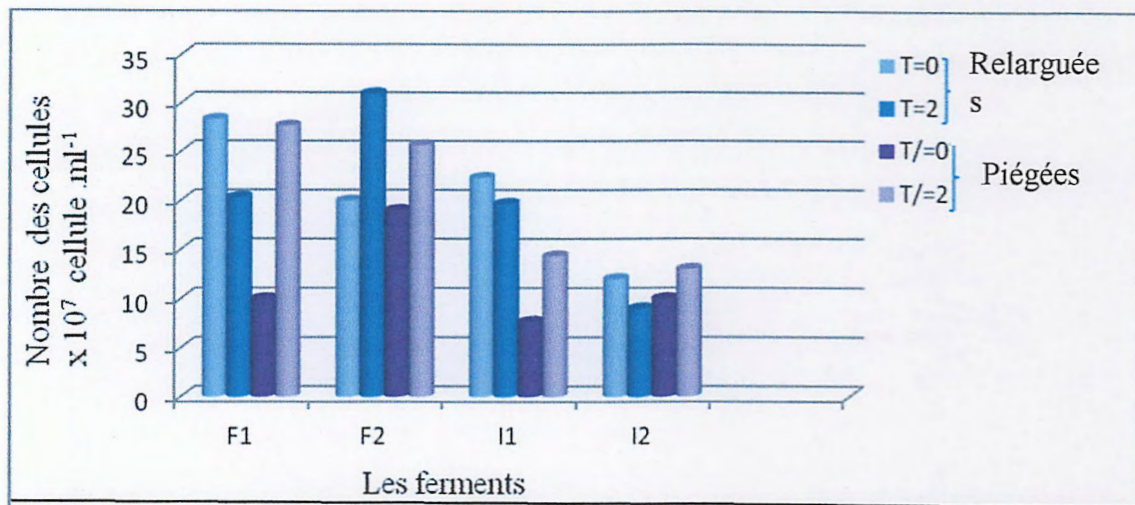


Figure 15 : Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH 2,5.

D'après les résultats illustrés par la Figure 16, le pourcentage de viabilité après 2 heures d'incubation sur milieu MRS pH2 diffère d'un ferment à un autre. La meilleure tolérance est celle du ferment **F2** (100%), ce dernier donne une croissance sur ce milieu hostile, par contre une perte en cellules estimée à 28.23%, 11.95% et 25.02% a été obtenue avec les ferments **F1**, **I1** et **I2** respectivement. Cependant, le dénombrement de cellules viables encapsulées a montré une protection significative des cellules contre l'agressivité du milieu acide à pH 2.



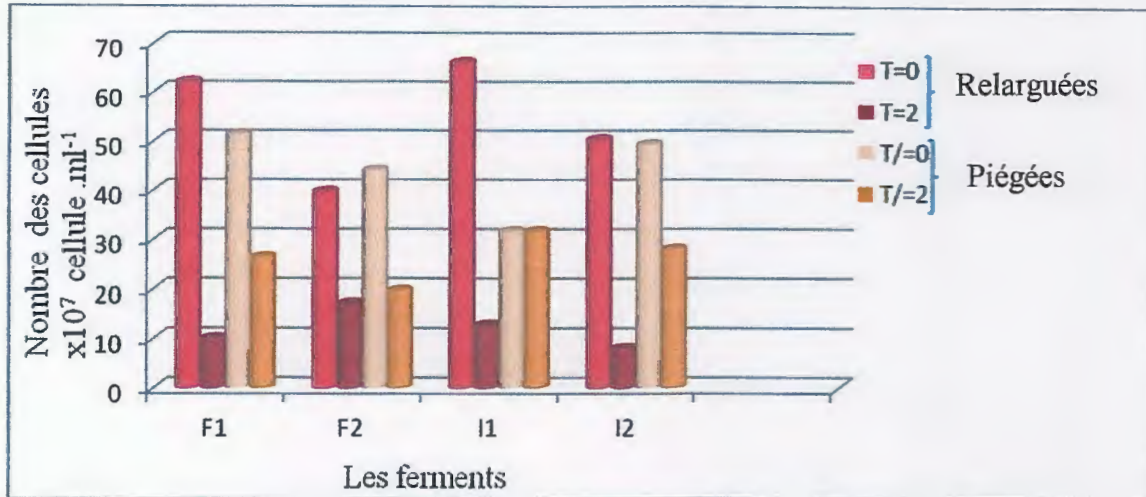
**Figure 16 :** Croissance des ferments locaux et industriels encapsulés sur milieu MRS pH 2.

Le dénombrement des cellules viables encapsulées montre que le milieu acide affecte la survie même après l'encapsulation des cellules mais de manière générale, les cellules persistent viables après 2 h d'incubation. **Gbassi (2010)**, a montré à travers une étude que les bactéries encapsulées dans les billes pourront survivre si un pH acide de l'ordre de 1,8 était retrouvé au niveau gastrique chez l'homme. De même, **Nan chen et al. (2005)**, ont trouvé à travers une étude que la microencapsulation avec de l'alginate de sodium assure la bonne protection des probiotiques à l'essai liquide acide gastrique.

#### III.4. 2.2. Résistance aux sels biliaires

Le but de cette expérience est d'étudier l'effet de l'encapsulation des ferments sur la tolérance aux sels biliaires. Les résultats illustrés par la figure 17, montrent une perte de viabilité pour l'ensemble des ferments et sous les deux formes. Cependant, il apparaît que les cellules piégées du ferment encapsulé **I1** présentent la meilleure résistance aux sels biliaires en milieu à pH 6.5 avec un taux de réduction nul par contre celles des ferments **F1**, **F2** et **I2**, montrent des taux de survie respectifs de 48.7%, 55,31% et 43,25%.

En outre, séchées par pulvérisation les capsules peuvent être enrobées par une couche supplémentaire afin de donner une protection contre l'environnement acide de l'estomac ou pour réduire l'effet nuisible de sels biliaires.

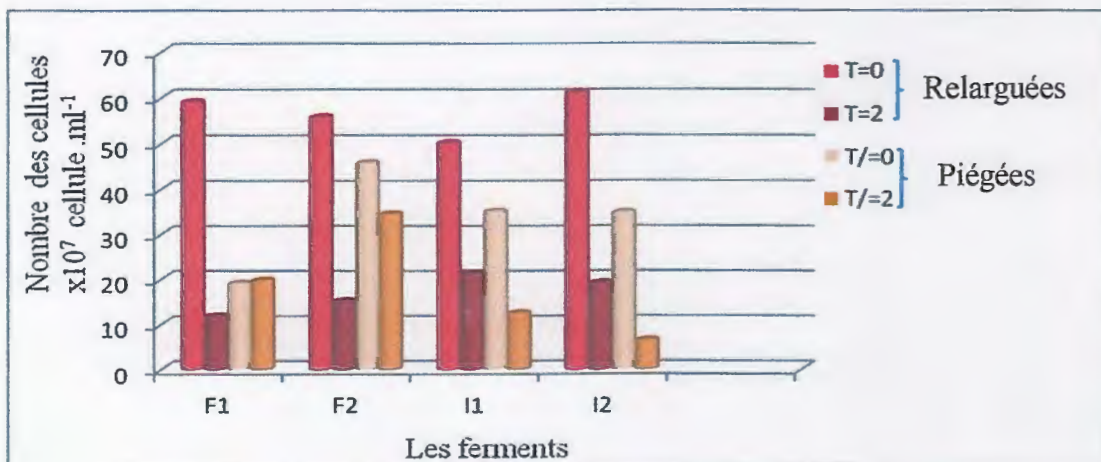


**Figure 17 :** Tolérance des ferments locaux et industriels encapsulés aux sels biliaires à pH 6,5.

On voit nettement que les ferments supportent très mal les conditions acides en présence des sels biliaires à pH 2,5. Au temps 0 h, il y avait en moyenne  $56,41 \times 10^7$  cellules  $\cdot \text{ml}^{-1}$ , après 2h il y en avait environ 3 fois moins.

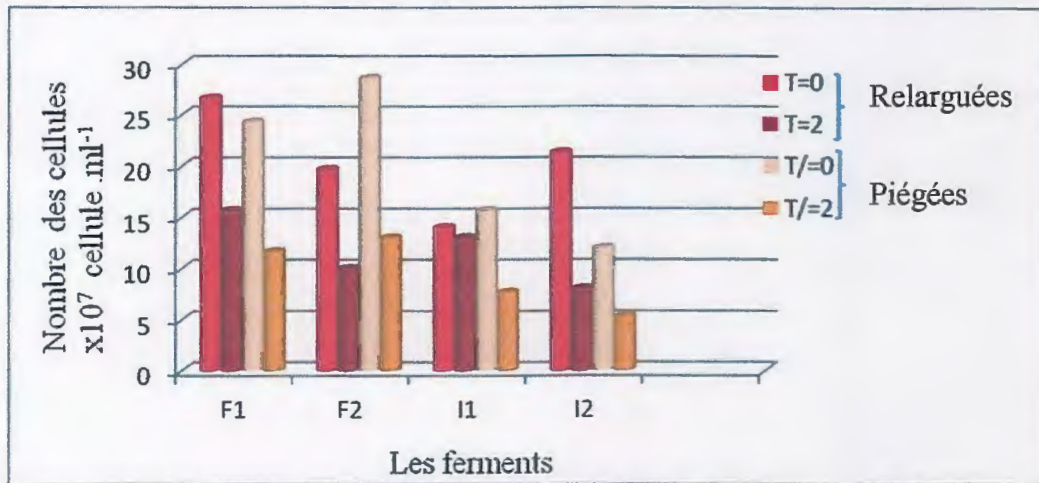
La décroissance du nombre de bactéries vivantes a été les plus importants après les 2 h d'incubation pour les cellules piégées des ferments **I1** et **I2** et leur taux de réduction est 64,76% et 81,73% respectivement. Cependant les cellules du ferment **F1** ont une meilleure résistance dont la micro-encapsulation agit en faveur de cette résistance contre les sels biliaires. Le ferment **F2** qui était moins résistant a montré un taux une perte en cellules de 24,81%.

Ces résultats correspondent aux résultats obtenus par **Messiad et Younsi (2011)**. Il apparait que le ferment **F1** micro encapsulé, est potentiellement le plus résistant aux conditions hostiles de milieu en présence de sel biliaire à pH 2,5.



**Figure 18:** Tolérance des ferments locaux et industriels encapsulés aux sels biliaires à pH 2,5.

Les résultats de la croissance sur milieu MRS pH2 et en présence de sel biliaire (figure 19), montrant que tous les ferments relargués sont sensibles au la bile et le taux de réduction est variable. Cependant, les cellules du ferment **I1** font de l'exception et montrent le plus faible taux de réduction (7,07%). On constate également que les ferments encapsulés restent viables même après deux heures d'incubation dans des conditions hostiles et que le nombre de cellules est réduit de moitié.



**Figure 19:** Tolérance des ferments locaux et industriels encapsulés aux sels biliaires à pH 2.

De l'ensemble des résultats obtenus (figures 17, 18 et 19), on a constaté que les ferments encapsulés sont sensibles aux sels biliaires comparativement aux résultats obtenus avec l'état libre, à l'exception du ferment encapsulé **F1** qui a présenté une meilleure tolérance aux sels biliaires et à pH 2,5.

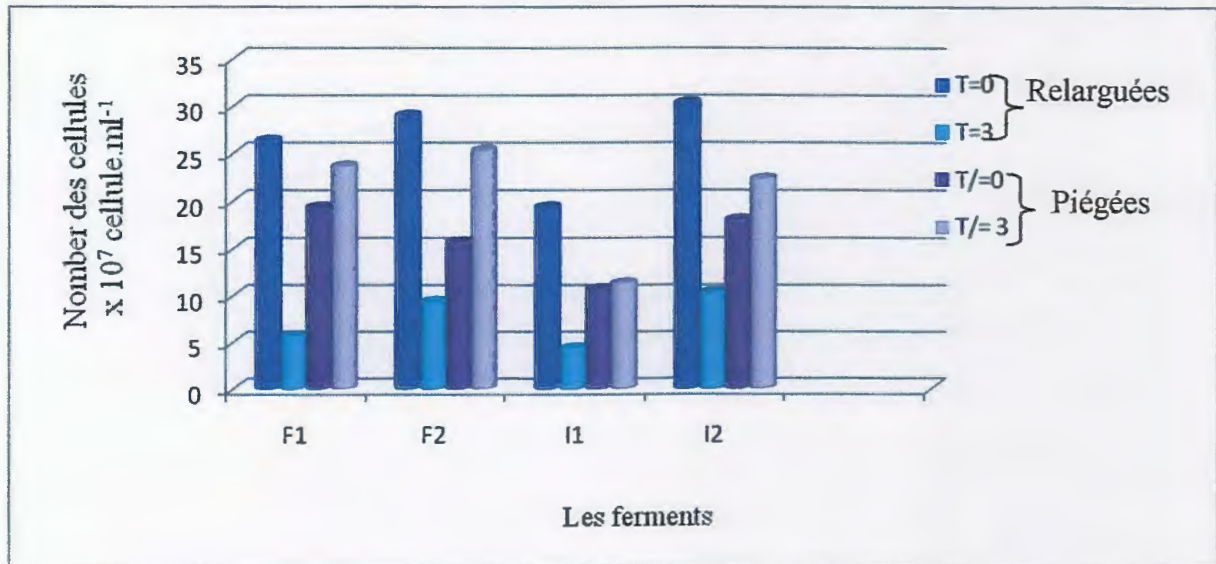
Selon **Khater (2010)**, l'encapsulation agit en faveur de la résistance des bactéries lactiques aux conditions hostiles telle que les sels biliaires.

Nous ne pouvons pas expliquer avec certitude ces résultats de résistance des ferments aux sels biliaires alors que le nombre de bactéries encapsulés vivantes après 2 heures a diminué. Cela peut être dû à une erreur de manipulation ou à une erreur de comptage.

### III.4.2.3. Réponse au stimulus stomaco – duodéal

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 20. La perte de viabilité a été importante après les 2 h d'incubation mais avec un taux de réduction variable. Il apparaît clairement que tous les ferments encapsulés résistent au suc pancréatique qui est considéré comme agent inhibiteur, avec une meilleure viabilité des cellules qui composent le ferment local **F2**.

D'une manière générale, on constate une nette amélioration de la résistance des tous les ferments particulièrement le ferment **F2** aux l'environnement gastrique après la micro-encapsulation.



**Figure 20:** Réponse des ferments locaux et industriels encapsulés au stimulus stomaco– duodéal.

Nos résultats se concordent et ceux de **Khater et al. (2010)**, qui a rapporté que la survie des souches encapsulés testées dans l'environnement gastrique a été nettement meilleur que celle de souches non-encapsulées. C'est ainsi que **Normand et al. (2006)** ont rapporté que la micro-encapsulation est une forme utilisée pour préserver les bactéries lactiques et leur permettre d'atteindre la fin du tractus intestinal.

# *Conclusion*

## Conclusion générale

Les résultats présentés dans ce travail permettent de fournir un ordre d'idée plus clair sur les performances des ferments locales et industriels du yaourt :

- Dans la première partie expérimentale de ce travail, nous avons constaté que les aptitudes des ferments locales sont presque identiques à ceux des ferments industriels mais dans la plus part des tests, les ferments locales ont une meilleure activité, particulièrement le ferment **F2**.
- L'étude des aptitudes probiotiques des deux ferments locales et industriels ont montré une sensibilité aux sels biliaries et aux sécrétions duodénales.
- D'autre part, les ferments probiotiques peuvent survivre en conditions gastriques et colonisent l'intestin, au moins temporairement, en adhérant à l'épithélium intestinal. Cependant, l'activité inhibitrice de ferments vis-vis de quelques souches de références, a montré que ces ferments sont capables de produire des substances à activité inhibitrice particulièrement par les ferments **F2** et **I2**.
- Dans la deuxième partie expérimentale, on a montré que la micro-encapsulation protège d'une manière efficace les probiotiques contre les conditions hostiles à l'exception des sels biliaries. Par ailleurs, les ferments encapsulés étaient résistants aux conditions gastriques simulées (pH 2), et la sécrétion duodénale, ce qui entraîne de façon significative l'amélioration de la survie en comparaison avec les ferments libres.
- D'après nos résultats, on peut dire que le ferment **F2** est le plus performant, donc, il pourra être proposé comme ferment de yaourt.



*Références*

*Bibliographiques*

## Reference

- Ait Belgnaoui A., 2006.** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thés de Doctorat. Toulouse. *Inst. National Polytechnique*.
- Allouch F.N., Hellal A. et Laraba A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *J. Nature & Technologie*.7: 13 -20.
- Ammor M.S. et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*.76 :138-146.
- Baliarda A., 2003.** Evaluation la reponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *pediococcus* et *tetragenococcus*. Thèse de Doctorat. Université de Poitiers.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert., 2008.** Productuon et cocervation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.
- Broadbent J.R., Mahon D.J., Welker D.L. et Oberg C.J., 2010.** Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*: A Review. *J. Dairy Science*. 86: 407-423.
- Bueno L., Marques D., Shinagawa FB., Quintino A. et Locatelli G., 2010.** Evaluation of probiotic containing microcapsules stability in different media. *Res. Int. Technol.* 5 :1-6.
- Burgain J., Gaiani C., Jeandel C., Cailliez-Grimal C., Revol A. et Scher J., 2012.** Maldigestion du lactose: formes cliniques et solutions thérapeutiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique, In Press*. 22 :199-204.
- Burgain J., Gaiani C., Linder M. et Scher1 J., 2011.** Encapsulation of probiotic living cells. 104 : 467– 483.
- Cerning J., 1990.** Exocellular polysaccharide produced by lactic acide bacteria. *Microbial. Rev.* 87 :113-130.
- Chen K.N., Chen M.J., Ruetliu J., Wenlin C. et YichiuI A., 2005.** Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *J. Food Microbiol.*70 :260-266.
- Cui R., Liu W., Qu X., Chen Z., Zhang X., Liu T. et Zhang L., 2012.** A two component system is involved in acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *Res. Issue Intest. Microbiol.* 167: 253-261.
- Dib H., Semaan E., Mrad R, Ayoub J., Choueiry L., Moussa H. et Bit ., 2011.** L'identification et evaluation de l'effet probiotique des Bacteries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *J. Lebanese Science* .13 :1-13.

- Doleyres Y., 2003.** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat. Université Laval. Québec.
- Drouault S. et Corthier G., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *INRA, EDP Sciences.* **32** : 101–117.
- Fanos V. et Bielory L., 2008.** Les probiotiques ravivent l'éclat de la peau. Probiotics and the skin *Clin Dermatol . Sci. Tec.* **26**(1): 4-11.
- Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brovvn J., Coolbear T., Holland R. et Kuipers O.P., 2000.** Clonig, characterisazion, controlled over expression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactobacillus lactis*. *App.Env.Microbiol.* **66** :1360-1368.
- Gaiani C., Jeandel C., Cailliez GC., Revol AM. et Scher J., 2012.** Maldigestion du lactose. *Food control .70* :1-65.
- Gagnon D., 2006.** Formulation et propagation de ferments lactique mesophiles à haut caractère aromatique. Thèse de Doctorat. Université Laval. 263.
- Gbassi G. K., 2010.** Aspects physicochimique de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat. Université strasbourg.160.
- Grattepanche F., 2005.** Etude d'un système de prefermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisee fonctionnelle. Thèse de doctorat .Université Laval. 260.
- Gu R., Yang Z., Li Z., Chen S. et Luo Z., 2008.** Probotic properties of latic acid bactéria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guuangxi, China. *Anaerobe.* **14** : 313-317.
- Guirad J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. **50** :90-292.
- Hansen E., 2011.** Approche microbiologique des yogourts et probiotiques. *Rev. Nat. Tec.* **40** :1- 48.
- Hariri A., Ouis N., ahnoun F et Djila B., 2009.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environ .50* :37-55.
- Harnett G., Davey A., Patrick C., Caddick L., 2011.** Lactic Acid Bacteria *Streptococcus thermophilus*: *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2<sup>e</sup> Ed. 143-148.
- Henry R., 2011.** Caractérisation des régulateurs transcriptionnels Rgg et étude du rôle de la protéine Rgg0182 de *Streptococcus thermophilus*. Thèse de Doctorat. Université Henri poincaré. 245.
- Hermann E., 2011.** Les probiotiques. *Int. J. Nutrition.* **137** :1-39.
- Hydrominus B., Marrec P. et Hadja S.A., 2000.** Acid and bile tolerance or spore-forming lactic acid bacteria *Int. J. Food Microbiol.* **61**: 193-197.

**Idoui T., et Karam N.E., 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel 's butter : isolation, identification and majour technological traits. *Gr. Y. Aceites.* **59(4)** : 361-367.

**Iyer R., Tomer S.K., Kapila S., Mani J.et Singh R., 2010.** Probiotic of folate producing *Streptococcus thermophilus* strain. *J. Food Sesear Inter.* **43** :103-110.

**Khater A.A., Ali M.A et Ahemed E.A., 2010.** Effect of microencapsulation on some Probiotic criteria. *J. American Science.* **6** (10): 836/845.

**Kos B., Suskovic J.,Vukovic S., Simpraga M., Frece J. et matosic S., 2003.** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy. J.* **94**: 981-987.

**Krasaekoopt W., Bhandari B. et Deeth H., 2003.** Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy. J.* **13** :3-13.

**Leveau J.Y., Bouix M . et De Roissart H.B., 1991.** La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les indistries agroalimentaire 2<sup>e</sup> Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. **3**: 2-40.

**Lin W.H ., Yu B., Jang SH.et Tsend HY., 2007.** Different probiotic propertes for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe. Food. Chem.* **13** :107-113.

**Luquet F. et Corrieu G., 2008.** Bactéries lactiques et probiotiques. Paris: Lavoisier Tec & Doc.

**Luquet F. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. Paris : Lavoisier Tec & Doc.

**Malcinga M., 1985.** Etude de la fabrication des yaourts en republique populaire du congo. Thèse de Doctorat. Université de CLERMONT II .174.

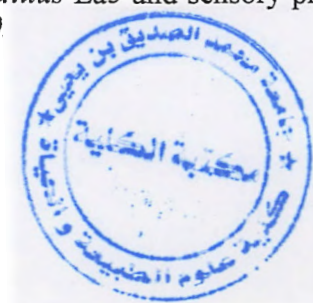
**Maarten Van M., 2006.** *Lactobacillus bulgaricus* – les leçons de sa séquence génomique. *Int. National de la Recherche Agronomique, INRA, Unité de Génétique Microbien, Jouy-en-Josas, France.* **30** :1-6.

**Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K. et Holzapfel W.H., 2008.** Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 57-64.

**Mende S., Krzyzanowski L., Weber J., Jaros D. et Rohm H., 2011.** Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Int. J. Biotechnol.* **92**: 141-151.

**Messiad S.et Younsi H., 2011.** Etude comparative des aptitudes technologiques et probiotiques des ferments mixtes et purs microencapsulée et des cellules libres. Memoire de Master. 59.

**Mirzaei H., PourjafarH. et Homayouni A., 2012.** Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *J. Food Chemistry.* **132**: 1966-1970



**Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G .et Luquet F .M.).Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512 – 592.

**Mozzi F., Torino M.I .et Valdez G.F., 2001.** Identification of exopolysaccharide –producing lactic acid bacteria .Methods in biotechnology .*Food microbiol.protocols. Humana Press.14* :183-190.

**Morge S., 2004.** Cuide d'appiu technique pour l'accident de fromagerie à la ferme. *J. Sci. Res. 5* : 1-43.

**Nan Chen N K, Juchen N.C., Rwei C.J., Lin C.W. et Chiu A.H., 2005.** Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *J. Food Microbio . Safety.70* : 260-266.

**Nguyet Thu. H., 2008.** Etude de la flore lactique du NEM CHUA, produits carné ferments cru traditionnel du sud vietnam et maitrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat. Université Bordeaux I. 255.

**Normand M., Ouest I. et Richaux R., 2006.** Proprieties probiotique des bactéries probioniques laitieres. Programme de nutrition santé en Bretagne. 1- 42.

**Palomares I., Morales P. et Félix A., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Lantinoam Microbiol. 49* (3-4): 46-54.

**Quintino A ., Locatelli G., Pereira C ., 2008.** Evaluation of probiotic containing microcapsules stability in different media. *Eur Fur Food Res Technol.* 1-6.

**Rahman M., Kim WS., Kumura H. et Shimazaki K., 2008.** *In vitro* effects of bovine lactoferrin on autoaggregation ability and surface hydrophobicity of bifidobacteria. *J. Dairy Food Science. 14* :73–77.

**Rajagopal S.N., et Sandine W.E., 2010.** Associative Growth and Proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Skim Milk. *J. Microbiolo. 70-73.*

**Rieu A., 2012.** Activité probiotique de souches de *Lactobacillus* spp. sous forme de biofilm. *Ins. Vigne et du Vin .1-31.*

**Righi M., 2006.** Microorganismes en action : le yaourt, PISTES, FSE. Thèse de doctorat. Université Laval. 221.

**Rizk Z., 2005 .** Caracterisation moleculaire des bacteries lactiques des levains de panification. These de doctorat .Université de Rennes. 212.

**Robin J. et Rouchy A., 2001.** Les probiotiques. *J. Nutrition. Prévention et Santé.* 1-8.

**Rokka S. et Rantàmaki P., 2010.** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation : challenges for industrial application. *Eur. Food Res Technol. 231* :1-12.

**Roos S. et Jonsson H., 2002.,** A high-molecular mass cell-surface protein frpm *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *J. Microbiolo. 148* :433-442.

**Schillinger U., Guigs C. et Holzapfel W.H., 2005.** *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products *Int. Dairy J.* **12** :1289-1297.

**Sodini I., Remenf F., Haddad S. et Corrieu G., 2004.** The relative effect of milk base,starter and process on yogurt texture: A review. *Critical Reviews in food science and nutrition* .**44**: 113-137.

**Soustre Y., 2009.** Les bactéries lactiques. *Humana Press.Totowa.* **30** : 1-6.

**Surawicz M.C., 2010.** Le microbiote dans les diarrhées infectieuses .Gastroentérologie Clinique et Biologique . **34** : 31-40.

**Viscoco Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U. et Holzapfel W.H .,2006.**Lactobacillus ssp.with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. Food. Microbiol.* **109** :205-214.

**Vuillemerd G., 1986.** Microbiologie des aliments. Volume 3. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Paris : Lavoisier Tec & Doc.

**Wu M.H., Pan T. M.,Wu Y..J.C.Y., 2010.**Exopolysacchride activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 1-7.

**Xanthopoulos V., Petridis D. et Tzanetakis N., 2001.** Characterization and Classification of *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* Strains isolated from Traditional Greek Yogurts. *J. Food Microbiol.* **66** : 747-752.

**Zago M., Fornassari M.E., Carminati D., Burns P., Suàrez V., Vinderola G., Reinheimer J.et Giraffia G.2011.**Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus palantarum* strains isolated fromcheeses. *J. Food Micorobiol.* **28**: 1033-1040.

# *Annexes*

## Annexe I

### Composition des milieux de cultures, tampon, réactifs et colorants

<b>▪ Bouillon MRS</b>	
Peptone .....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose .....	20g
Tween80.....	1ml
Phosphate dipotassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse .....	0,05g
Eau distillé .....	1000ml
<b>▪ Milieu YMA (Yeast Milk Agar)</b>	
Peptone.....	5g
Extrait de levure.....	3g
Lait écrémé.....	1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
<b>▪ Milieu hypersaccharosé</b>	
Bactropeptone.....	2,5g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	3g
Saccharose.....	150g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
NaCl .....	1g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
<b>▪ Gélose A /B</b>	
Extrait de viande.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
Pourpre de bromocresole.....	0,006%
<b>▪ Gélose au triglycéride</b>	
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	5g
Agar.....	15g
Triglycéride.....	10g
Eau distillée.....	1000ml



<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>PBS (Phosphate Buffer Saline)</b></li> </ul>	
NaHPO <sub>4</sub> .....	10,9g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,2g
NaCl.....	90g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Sulfate urea magnesium sulfate buffer</b></li> </ul>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O.....	22,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	7,26g
Urée.....	1,8g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,02g
Eau distillé.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Solution de Ringer</b></li> </ul>	
NaCl.....	9g
KCl.....	0,42g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,48g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,2g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Tampon phosphate (1M)</b></li> </ul>	
Tompan dipotassique.....	1,5ml
Tompan monophosphate.....	38,5ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Tampon dipotassique</b></li> </ul>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	17,41g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Tampon monophosphate</b></li> </ul>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,6g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Chlorure de sodium CaCl<sub>2</sub> (0,05M)</b></li> </ul>	
CaCl <sub>2</sub> .....	5,5g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Sels biliaires à 10%</b></li> </ul>	
Sels biliaires.....	10g
Eau distillée.....	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Sécrétion duodénale</b></li> </ul>	
NaCl.....	2g
HCl.....	10g
Pancrétine.....	10g
NaOH à 0,2N.....	250ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Lait écrémé stérile à 12%</b></li> </ul>	
Lait écrémé en poudre.....	12g
Eau distillée.....	100ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Violet de Gentiane</b></li> </ul>	

Violet de Gentiane.....	1g
Ethanol à90%.....	10ml
Phénol .....	2g
Eau distillée .....	100ml

▪ **Fushine de Ziehel**

Fushine basique.....	1g
Alcool éthylique à90%.....	10g
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

▪ **Lugol**

Iode.....	1g
Iodure.....	2g
Eau distillée.....	300ml

## Annexe II

**Tableau 01:** Pouvoir acidifiant des ferments thermophiles locaux et industriels.

Les ferments Lactique	T <sub>0</sub> après ensemencement		Après 2h d'incubation		Après 4h d'incubation	
	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)
F1	6,67	26,0	6,62	29,0	6,55	29,5
F2	6,42	31,0	6,38	31,5	6,27	37,5
I1	6,64	24,5	6,54	27,0	6,48	28,5
I2	6,60	30,0	6,44	30,5	6,25	37,5

Après 6h d'incubation		Après 16h d'incubation		Après 18h d'incubation		Après 42h d'incubation	
pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)
6,2	31,0	6,07	34	5,87	39,0	5,12	75
5,78	39,0	5,13	60	4,66	70,7	4,45	125
6,28	30,0	6,22	38	6,13	40,0	4,83	81,7
5,45	38,5	4,65	86	4,49	91,0	4,48	99
Acidité (°D) = V <sub>NaOH</sub> X 10							

**Tableau 02 :** Production d'acide lactique par des ferments thermophiles locaux et industriels.

Ferments / Temps	T <sub>0</sub>	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 16h	Après 18h	Après 42h
F1	2,60	2,90	2,95	3,10	3,4	3,90	7,5
F2	3,10	3,15	3,75	3,90	6	7,07	12,5
I1	2,45	2,70	2,85	3	3,8	4	8,17
I2	3	3,05	3,75	3,85	8,6	9,1	9,9

**Tableau 03 :** Tolérance des ferments industriels et locaux aux acides.

pH	Ferments	T <sub>0</sub> après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,469	23,99	0,519	26,66
	F2	0,493	28,66	0,548	31,99
	I1	0,365	18,33	0,480	20,66
	I2	0,398	24,66	0,503	33
2,5	F1	0,674	23,99	0,549	19,33
	F2	0,712	29,66	0,730	31,66
	I1	0,562	22,33	0,578	22,66
	I2	0,637	29,66	0,541	25,99
2	F1	0,469	21,33	0,519	26,66
	F2	0,493	26,33	0,548	32,33
	I1	0,381	19	0,480	19,33
	I2	0,398	26,66	0,503	31,0

**Tableau 04:** Taux de réduction de la résistance (%) des ferments locaux et industriels aux acide à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	/	19,42	/
F2	/	/	/
I1	/	/	/
I2	/	12,37	/

**Tableau 05 :** Résistance des ferments industriels et locaux aux sels biliaries.

pH	Ferments	T0 après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,493	41,33	0,367	18,66
	F2	0,577	33,66	0,483	25,33
	I1	0,780	50	0,775	21,66
	I2	0,721	39	0,687	15,99
2,5	F1	0,790	35,66	0,442	10,66
	F2	0,584	26,99	0,522	15
	I1	0,789	48	0,826	24
	I2	0,700	35	0,606	8,99
2	F1	0,586	15,33	0,524	13,66
	F2	0,661	42,66	0,600	15,33
	I1	0,805	28,66	0,887	13
	I2	0,780	25,99	0,891	12,66

**Tableau 06:** Taux de réduction(%) de la résistance des ferments locaux et industriels aux sels biliaries à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	54,48	70,10	10,17
F2	23,21	44,42	64,06
I1	56,68	50	54,64
I2	59	60,19	51,28

**Tableau 07 :** Réponse des ferments locaux et industriels au stimulus stomaco-duodéal.

Les ferments	Solution de Ringer		T0 après l'ensemencement		Après 1h d'incubation		Après 2h d'incubation	
	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
F1	0,516	34	0,72	11	0,710	11,66	0,758	18
F2	0,680	26	0,681	6,99	0,666	12,33	0,730	14,99
I1	0,457	9,99	0,59	10,66	0,645	10	0,642	8
I2	0,444	23,66	0,41	10,99	0,706	9,66	0,798	11

**Tableau 08 :** Taux de réduction (%) de la résistance des ferments locaux et industriels au stimulus

stomaco-duodéal.

Les ferments	taux de réduction (%)
F1	/
F2	/
I1	24,95
I2	/

**Tableau 09:** Valeurs des densités optique d'autoaggrégation des ferments locaux et industriels.

DO <sub>600</sub> Ferments	Après 1h d'incubation	Après 2h d'incubation	Après 3 h d'incubation	Après 4h d'incubation	Après 5h d'incubation
F1	0,224	0,170	0,106	0,067	0,605
F2	0,323	0,071	0,043	0,039	0,039
I1	0,279	0,224	0,053	0,06	0,068
I2	0,511	0,5	0,246	0,14	0,102

**Tableau 10:** Taux d'auto- agrégation (%) des ferments locaux et industriels.

Taux d'autoaggrégation Ferments	T <sub>0</sub> avant l'incubation	Après 1 h d'incubation	Après 2 h d'incubation	Après 3 h d'incubation	Après 4 h d'incubation
F1	0	24,1	52,67	70,09	73
F2	0	78,01	86,68	87,92	87,92
I1	0	19,71	81	78,49	75,62
I2	0	2,15	51,86	72,6	76,51

**Tableau 11 : Pouvoir acidifiant des ferments thermophiles locaux et industriels encapsulés.**

Les ferments encapsulé	T <sub>0</sub> après ensemencement		Après 2h d'incubation		Après 4h d'incubation	
	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)
I1	6,64	22,5	6,24	30	6,11	31,5
I2	6,65	20,0	6,34	27,5	6,04	27,5
F1	6,65	17,5	6,36	22,5	6,06	33
F2	6,63	15,0	6,42	15,5	6,09	22,5

Après 6h d'incubation		Après 16h d'incubation		Après 18h d'incubation	
pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)	pH	Taux d'acidité (° D)
5,95	32,5	5,30	38,5	5,09	46,0
5,79	40,0	5,43	59	5,12	72,5
5,81	34,0	5,4	40,5	4,90	62,5
5,97	26	5,39	43,5	5,12	45,5

**Tableau 12 : Production d'acide lactique par des ferments thermophiles locaux et industriels encapsulés.**

Ferments / temps	T <sub>0</sub>	Après 2h	Après 4h	Après 6h	Après 16h	Après 18h
F1	2,55	3,00	3,15	3,25	3,85	4,60
F2	2,0	2,40	2,75	4,0	5,9	7,25
I1	1,75	2,25	3,30	3,40	4,05	6,25
I2	1,50	1,55	2,25	2,60	4,35	4,55

**Tableau 13 :** Tolérance des ferments industriels et locaux encapsulés aux acides (Cellules piégées par les capsules).

pH	Ferments	T0 après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,015	30,99	0,034	36,99
	F2	0,16	49	0,08	39
	I1	0,154	40,33	0,10	31,66
	I2	0,13	53	0,099	49
2,5	F1	0,341	33,66	0,135	24,66
	F2	0,281	29,99	0,072	20,99
	I1	0,285	28,66	0,019	19,66
	I2	0,309	30,66	0,013	18,66
2	F1	0,121	28,33	0,026	20,33
	F2	0,034	19,99	0,121	30,99
	I1	0,099	22,33	0,079	19,66
	I2	0,096	11,99	0,062	8,99

**Tableau 14 :** Taux de réduction de la résistance (%) des ferments locaux et industriels (cellules piégées par les capsules) aux acides à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	/	26,73	28,23
F2	20,40	32,09	/
I1	23,13	31,4	11,95
I2	7,54	39,13	25,02



**Tableau 15 :** Tolérance des ferments industriels et locaux encapsulées aux acides (Cellules relarguées).

pH	Ferments	T0 après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,03	11,99	0,089	13,99
	F2	0,017	28	0,027	45
	I1	0,053	37,33	0,041	39
	I2	0,013	25	0,045	49,33
2,5	F1	0,113	12,66	0,01	24,66
	F2	0,057	15,33	0,021	23,99
	I1	0,069	28,99	0,053	31,33
	I2	0,091	17,66	0,042	21,66
2	F1	0,167	9,99	0,151	27,66
	F2	0,529	19	0,422	25,66
	I1	0,046	7,66	0,025	14,33
	I2	0,091	10	0,13	13

**Tableau 16 :** Taux de réduction de la résistance (%) des ferments locaux et industriels (cellules relarguées) aux acides à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	/	/	/
F2	/	/	/
I1	/	/	/
I2	/	/	/

**Tableau 17:** Résistance des ferments industriels et locaux encapsulés aux sels biliaires (Cellules piégées par les capsules).

pH	Ferments	T0 après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,030	62	0,30	09,99
	F2	0,027	39,66	0,030	17
	I1	0,010	66	0,435	12,66
	I2	0,098	50,33	0,504	07,99
2,5	F1	0,030	59	0,067	11,66
	F2	0,010	55,66	0,055	15
	I1	0,017	49,99	0,068	21
	I2	0,023	61	0,043	19
2	F1	0,024	26,66	0,094	15,66
	F2	0,038	19,66	0,105	09,99
	I1	0,037	13,99	0,109	13
	I2	0,024	21,33	0,071	07,99

**Tableau 18:** Taux de réduction(%) de la résistance des ferments locaux et industriels (cellules piégées par les capsules) aux sels biliaires à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	83,88	80,23	41,26
F2	57,13	73,05	49,18
I1	80,81	57,99	7,07
I2	85,81	68,85	61,95

**Tableau 19:** Résistance des ferments industriels et locaux encapsulés aux sels biliaires (Cellules relarguées).

pH	Ferments	T0 après l'ensemencement		Après 2h d'incubation	
		DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
6,5	F1	0,01	51,33	0,195	26,33
	F2	0,052	44	0,057	19,66
	I1	0,039	31,66	0,148	31,66
	I2	0,015	49,33	0,102	27,99
2,5	F1	0,01	19	0,044	19,66
	F2	0,045	45,66	0,028	34,33
	I1	0,039	34,99	0,034	12,33
	I2	0,049	34,66	0,088	06,33
2	F1	0,041	24,33	0,014	11,66
	F2	0,038	28,66	0,120	13
	I1	0,036	15,66	0,104	07,66
	I2	0,044	11,99	0,190	05,33

**Tableau 20:** Taux de réduction(%) de la résistance des ferments locaux et industriels (cellules relarguées) aux sels biliaires à différents pH.

Les ferments	pH 6,5	pH 2,5	pH 2
F1	48,7	/	52,07
F2	55,31	24,81	54,64
I1	/	64,76	51,08
I2	43,25	81,73	55,54

**Tableau 21 :** Réponse des ferments locaux et industriels encapsulés au stimulus stomaco-duodénal (cellules piégées par les capsules).

Ferments	Après 1h d'incubation		Après 2h d'incubation		Après 3h d'incubation	
	DO <sub>660</sub> nm	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
F1	0,032	26,33	0,063	21	0,046	05,66
F2	0,01	28,99	0,021	09,99	0,045	09,33
I1	0,017	19,33	0,048	17,33	0,021	04,33
I2	0,09	30,33	0,01	18,33	0,059	10,33

**Tableau 22:** Taux de réduction de la résistance des ferments locaux et industriels encapsulés (cellules piégées par les capsules) au stimulus stomaco-duodéal.

Les ferments	taux de réduction (%)
F1	78,5
F2	67,81
I1	77,59
I2	65,94

**Tableau 23 :** Réponse des ferments locaux et industriels encapsulés au stimulus stomaco-duodéal (cellules relarguées).

Ferments	Après 1h d'incubation		Après 2h d'incubation		Après 3h d'incubation	
	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml	DO <sub>660</sub>	Nombre de cellules x 10 <sup>7</sup> /ml
F1	0,096	19,33	0,082	19,66	0,014	23,66
F2	0,023	15,66	0,017	15,33	0,020	25,33
I1	0,015	10,66	0,01	10,99	0,031	11,33
I2	0,085	18	0,039	07,33	0,041	22,33

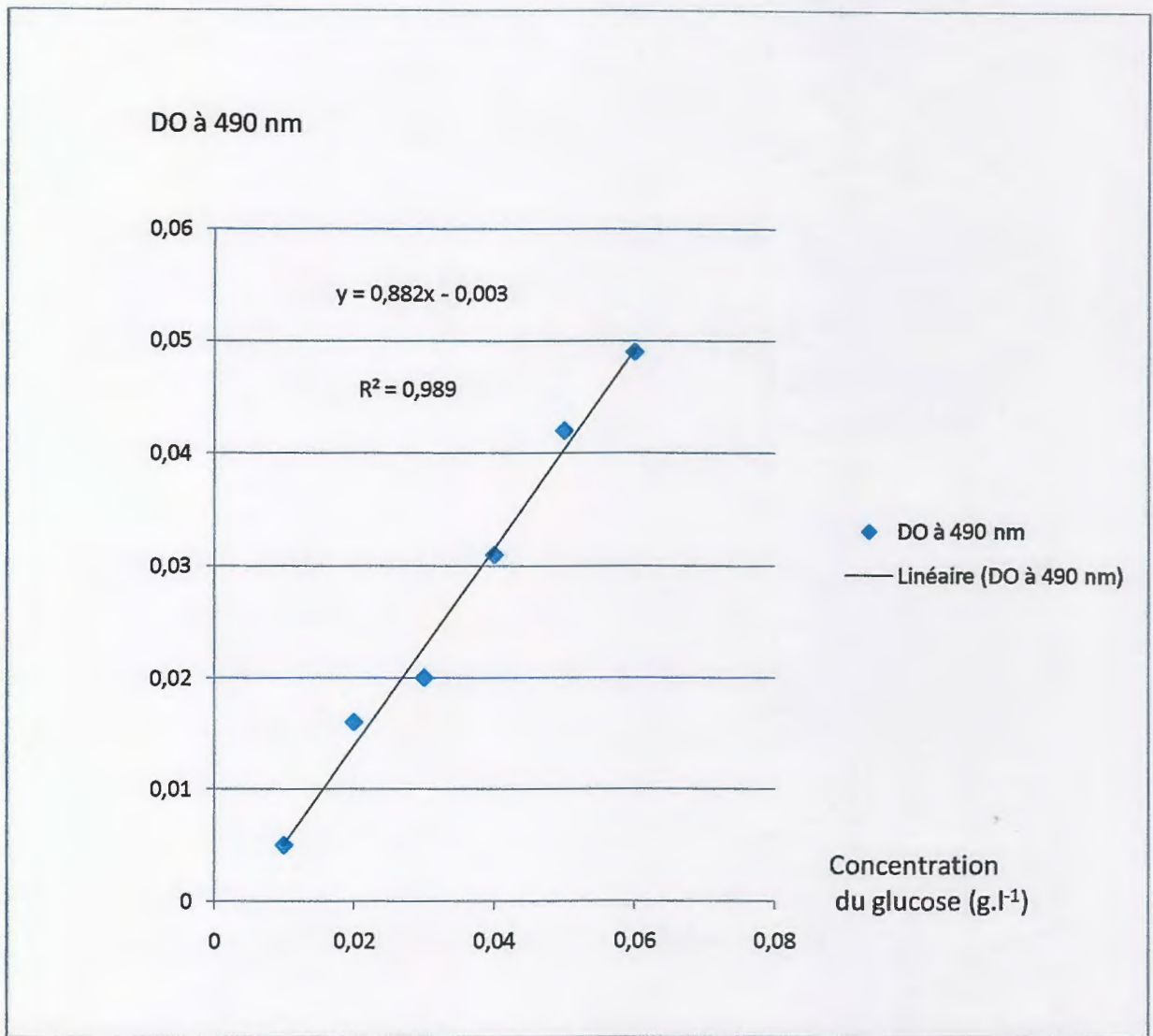
**Tableau 24:** Taux de réduction de la résistance des ferments locaux et industriels (cellules relarguées) au stimulus stomaco-duodéal.

Les ferments	taux de réduction (%)
F1	/
F2	/
I1	/
I2	/

**Tableau 25:** Concentrations du glucose et les densités optique correspondante pour tracé la courbe d'étalonnage.

Concentration du glucose(g/l)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
DO <sub>490</sub>	0,005	0,016	0,020	0,031	0,042	0,049

### Annexe III : Courbe d'étalonnage



**Présenté par :** Moubarek Fairouz  
Boulbair Hayet

**Encadreur :** Dr : Idoui T.

**Nature du diplôme :** Master 2 en microbiologie Appliquée

**Thème :** Effets de la microencapsulation sur les aptitudes technologiques et probiotiques des ferments thermophiles locales et industriels

### Résumé

Notre travail a été focalisé sur l'étude des performances technologiques et probiotiques des ferments thermophiles locaux et industriels libres et micro-encapsulés. Les résultats ont montré que les performances des ferments locaux sont presque identiques à ceux des ferments industriels. La micro-encapsulation améliore les aptitudes technologiques et probiotiques des ferments locaux. Enfin, les meilleurs résultats sont obtenus avec le ferment local F2, qui est un bon candidat pour la production de yaourt.

**Mots clés :** ferment locale, ferment industriel, micro-encapsulation, probiotique.

### Abstract

Our work was focused on the study of technological performance and probiotics properties of free and microencapsulated thermophilic starter (local and industrial). The results showed that the performance of local starter are almost identical to those industrial. The microencapsulation improves the technological traits and probiotic properties of our local starter. Finally, the best results were obtained with the local starter coded F<sub>2</sub>, which is a good candidate for the yogurt production.

**Keywords:** local starter, industrial starter, microencapsulation, probiotic.

### المخلص

لقد تركز عملنا على دراسة الأداء التكنولوجي و البروبيوتيك للخمائر المحبة للحرارة المحلية و الصناعية الحرة منها و المكسلة. النتائج المتحصل عليها تظهر أن مهارات الخمائر المحلية تقريبا تتشابه بالصناعية. الكبسلة حسنت في الأداء التكنولوجي و البروبيوتيك للخمائر المحلية. في النهاية نجد أن أحسن النتائج المتحصل عليها كانت مع الخميرة المحلية F2 التي يمكن ترشيحها لإنتاج اللبن.

**الكلمات المفتاحية :** الخمائر المحلية ، الخمائر الصناعية ، الكبسلة ، البروبيوتيك .

