

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de : Biologie



Mémoire de fin d'étude
*En vue de l'obtention d'un diplôme de **Master** en*
***Domaine** : Sciences de la Nature et de Vie*
***Filière** : Biologie*
***Spécialité** : « Microbiologie Appliquée »*

Thème :

*Caractérisation de la flore lactique d'une Choucroute
locale et évaluation de sa valeur nutritive*

Présenté par :

❖ M^{me} Arachiche Aida

❖ M^{me} Ghessab Keltoum

Devant le jury :

Présidente :	Mme Daoudi A	M.A.A	UDBKM
Examineurs :	Mme Zaouadi N	M.A.A	UDBKM
	Mme Laissaoui A	M.A.B	UDBKM
Invité :	Mr Arous FN	M.C.B	UDBKM
Promotrice :	Mme Sadi F	M.C.B	UDBKM
Co-promoteur :	Mr Ziane Ammar Dj		UDBKM

Année universitaire : 2017 / 2018



REMERCIEMENTS

*Initialement et avant tout nous remercions **ALLAH** qui nous a donné du courage et de la patience pour arriver à terme de ce travail.*

*Nous vifs remerciements vont au **Mme DAOUDIA** pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider ce jury.*

*Nous chaleureux remerciements s'adressent également à **Mme ZAOUADI N, Mme. LAISSAOUI A. S** et **Mme AROUS FN** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promotrice **Mme. SAADI FADHILA** pour l'aide compétente qu'elle nous a apportée, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieuse pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire, nous la remercions vivement.*

*Ensuite nous tenons à remercier notre Co-promoteur **Mr. ZIANE AMMAR DJAMEL** de nous avoir encadrés, ainsi que pour sa disponibilité et ses Remarques constructives tout le long de ce mémoire. Aussi de nous avoir permis d'approfondir nos connaissances dans le domaine chimique et de nous avoir fait profiter de ses connaissances*

*D'autres personnes nous ont encouragés à finir ce travail par des gestes d'amitié dont nous sommes reconnaissants. À titre d'exemple, nous citerons **Mme. NEDJMAOUI AICHA, Mme. RAIS AICHA, Mme BENREKEIA HAYET** et **Mme AOUAR KHADIDJA** pour nous avoir aidés dans les manipulations ainsi que pour l'obtention d'accessoire très utile pour l'avancement de la thèse. Ou encore pour nous avoir souvent assisté afin de terminer nos analyses et encourager dans les moments difficiles.*

Nos remerciements à nos très chers parents pour l'amour qu'elle nous a porté et pour leurs soutiens et leur patience

Nous ne nous oublions jamais à adresser nos remerciements à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation et nos très chers amis pour l'aide, le courage et le soutien physique et moral dans les moments difficiles durant toute notre formation.

Enfin un grand remerciement à tous les travailleurs de la faculté des sciences de nature et de vie. Au terme de ce travail, nous tenons à remercier chaleureusement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

DEDICACE

Je dédie ce mémoire de tout mon cœur à :

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : ARACHICHE KHEIRA

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Que Dieu le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRÈS CHER PÈRE : ARACHICHE BELKACEM

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mes très chères sœurs : « ZOLA ; BOUCHRA ; AMINA ; WAHIBA ; KANZA »

A mon frère « TAHER »

Une très grande dédicace à une personne très chère à mon cœur : « ABDERAHMANE »

A tous la famille ARACHICHE.

A ma binette « KELTOUM ».

A mes amies « ALAA EDDINE ; FARAH ; HADJER ; KHALIL ; AZIZA ; NADIR ; LEILA ; MERIEM et AMINE »

A toutes la promotion 2017/2018 de MICROBIOLOGIE APPLIQUE



DEDICACE

Je dédie ce mémoire de tout mon cœur à :

A ma famille

Mes parents

*Ma mère **KHEIRA**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père **TAYEB**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mon petit frère «**FAYCEL** » et mes sœurs «**SABRINA ; FADHILA ; AMIRA et NOUR ELHOUDA** » qui ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mon oncle «**MOHAMMED** »*

A toute ma famille de proche ou de loin.

*A «**RIYAD** »*

*«**TOUFIK ; AYOUB et ABDO** »*

*A ma chère binette : «**AIDA** »*

A mes belles amies :

*«**MERIEM ; AZIZA ; LEILA ; IMANE ; LAMIA ; SARRA ; HADJER et WIAM** »*

A mes amis :

*«**ALAA EDDINE ; KHALIL ; MOHAMMED ; FAYCAL ; NADIR ; MOHAMMED ; ISLAM et GAOUSSOU** ».*

Redouane



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales utilisations des bactéries lactiques en agroalimentaires.....	17
Tableau 2 : principaux légumes crucifères consommables.....	20
Tableau 3 : caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches lactiques isolées de la 1 ^{ère} fermentation.....	51
Tableau 4 : caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches lactiques isolées de la 2 ^{ème} fermentation.....	53
Tableau 5 : profil fermentaire des isolats.....	55
Tableau 6 : Résultats de test de résistance aux antibiotiques.....	57
Tableau 7 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques.....	59
Tableau 8 : Valeurs nutritives pour 100 g de chou et de choucroute.....	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose.....	4
Figure 2 : différentes catégories de choux.....	21
Figure 3 : étapes de fabrication de la choucroute.....	29
Figure 4 : Conservation de longue durée des souches pures.....	31
Figure 5 : Traitements préliminaires apportés aux choux.....	38
Figure 6 : Aspect macroscopique a l'œil nu et sous la loupe des colonies des bactéries lactiques isolées après ensemencement en masse sur milieu MRS solide pendant 48h à 30°C.....	46
Figure 7 : Aspect des colonies des bactéries lactique sur milieu MRS liquide après 48h d'incubation à 30 °C.....	46
Figure 8 : Aspect des cultures pures des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après 48h d'incubation à 30°C.....	46
Figure 9 : Observation microscopique des coques et des bacilles après coloration de GRAM (Gx100).....	47
Figure 10 : Résultat de type de fermentaire sur MRS liquide après incubation 48 h à 30°C.....	47
Figure 11 : Croissance en milieu lait de Sherman à 1% et 3%.....	48
Figure 12 : Résultats de l'hydrolyse d'arginine sur milieu M16 BCP et sur milieu Moeller.....	48
Figure 13 : Résultats de la mobilité sur milieu mannitol après incubation 24h à 30°C.....	49
Figure 14 : Aspect des colonies des bactéries lactiques sur milieu MSE après incubation 24h à 30°C.....	49
Figure 15 : Révélation de la production d'acétoïne sur milieu Clark et Lubs après incubation 24h à 30° C..	50
Figure 16 : révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de colonies bleues sur le milieu KMK.....	50
Figure 17 : Résultats de fermentation des hydrates de carbure après incubation 24h à 30°C.....	54
Figure 18 : Résultats de tests d'antibiogramme après incubation 24h à30°C.....	56
Figure 19 : Aspect macroscopique des bactéries pathogènes après 24h d'incubation.....	58
Figure 20 : Inhibitions obtenues par les souches isolées.....	58
Figure 21 : Distribution du pourcentage des isolats lactiques.....	62
Figure 22 : Variations du pH et d'acidité en fonction du temps de fermentation.....	64
Figure 23 : Variations du pH et d'acidité avant et après salage.....	65

LISTE DES ABREVIATIONS

ACK	: Acétate kénase
ADH	: Arginine dihydrolase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: Acide désoxyribonucléique ribosomique.
ADP	: Adenosine diphosphate.
AE	: Aeroanaérobie.
AG	: Acide Gras.
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists.
ARN	: Acide ribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique.
ATCC	: American Type Culture Collection.
ATP	: Adenosine triphosphate.
B	: <i>Brassica</i> .
BCP	: Gélose au Pourpre de Bromocrésol Lactosée
BL	: Bactérie lactique.
BSA	: Albumine de Sérum Bovin,
Ca	: Calcium.
CoA	: Coenzyme A.
Cu₂O	: Oxyde de cuivre.
EMP:	: Embden Meyerhoff Parnas.
EPS:	: Exopolysaccharides.
FBA:	: Fructose 1-6 phosphate aldolase.
GC %	: Pourcentage guanine + cytosine de l'ADN.
GLK	: Glucokinase.
GRAS	: Generally Regraded As Safe.
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène.
H₂SO₄	: Acide Sulfurique.
Hét	: Hétérofermentaire.
HNO₃	: Acide Nitrique.
Hom	: Homofermentaire.
KMK	: Kempler Mac Kay.
LAB	: Lactic acid bacteria.
LDH	: Lactate Deshydrogénase.

LISTE DES ABREVIATIONS

MH	: Muller Hinton.
NaCl	: Chlorure de sodium.
MRS BCP	: Man <i>Rogosa Sharp</i> au pourpre de bromocrésol.
MRS	: Man <i>Rogosa Sharp</i> .
MSE	: Mayeux Sandine et Eliket.
NaCl	: Chlorure de sodium.
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide.
NADH, H⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide hydroxyperoxydase.
NaOH	: Hydroxyde de Sodium.
ND	: Non déterminé.
NH₃	: Ammoniaque.
OH	: Hydroxyde.
PCR	: Polymérase chaîne réaction.
Pg	: phosphogluconate.
PH	: Potentiel d'Hydrogène.
Pi:	: Phosphore.
Pk:	: phosphokétolase.
Ppm	: Partie par million.
REP	: Repetitive Extragenic Palindromic
S.T	: Solides Totaux.
SP	: Espèce.
Sub sp	: Sous-espèce.
tr	: Tour.
VP	: Voges-Proskauer.
VRG	: Gène de virulence.
XPC	: Xylose -5-Phosphate.

RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Ce sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières notamment végétales. Le légume fermenté qui a eu le sort historique le plus important est sans conteste est la choucroute, qui est le produit de la rencontre entre la fermentation lactique et une plante particulière, le chou. Notre étude a porté, en première partie, à la caractérisation de la flore lactique responsable de la fermentation du chou. L'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques de choucroute préparée nous a permis d'obtenir 54 souches réparties en trois genres : *Leuconostoc* (31,5%), *Lactococcus* (33,3%) et *Lactobacillus* (33,4%). L'étude de l'antagonisme a montré l'effet inhibiteur des souches isolées vis-à-vis *Staphylococcus aureus* 6538 et *Escherichia coli* avec des zones d'inhibitions allant de 6 à 17 mm. En deuxième partie, les analyses chimiques et biochimiques du chou avant et après fermentation nous a permis de conclure que notre aliment fermenté a une bonne valeur nutritive et qui peut construire une source riche en glucide (1,55 g/100g), protéines (0,75 g/100g), minéraux (1,66 g/100g), vitamines C (21 mg/100g), fibres alimentaires (0,41 g/100g), C'est aussi une bonne source de bactéries lactiques connues par leur statut GRAS et qui peuvent être des probiotiques.

Mots-clés : Bactéries lactiques, chou; choucroute, caractérisation phénotypique, antagonisme ; valeur nutritive.

ABSTRACT

The lactic bacteria present a big interest in the industry. It is microorganisms of food category that play an essential role in the fermentation of raw materials in particular plant. The fermented vegetable which had the most important historic fate(spell) is unquestionably is the sauerkraut, which is the product of the meeting between the lactic fermentation and the particular plant, the cabbage. Our study carried, in first part, in the characterization of the lactic flora responsible for the fermentation of the cabbage. The isolation and the phenotypic characterization of the lactic bacteria of prepared sauerkraut allowed us to obtain 54 stumps distributed in three genres: *Leuconostoc* (31,5 %), *Lactococcus* (33,3 %) and *Lactobacillus* (33,4 %). The study of the antagonism showed the inhibitive effect of isolated strains against *Staphylococcus aureus* 6538 and *Escherichia coli* with zones d inhibitions ranging from 6 to 17 mm. In second part, the chemical and biochemical analyses of the cabbage before and after fermentation allowed us to conclude that our fermented food has a good nutritional value and which can build a source rich in carbohydrate (1,55 g/100g), proteins (0,75 g/100g), minerals (1,66 g/100g), vitamins C (21 mg/100g), food fibers (0,41 g/100g), It is also a good source of lactic bacteria known by their FAT status and which can be probiotics.

Keywords: lactic bacteria, cabbage; sauerkraut, phenotypic characterization, antagonism; Nutritional value.

الملخص

بكتيريا حامض اللاكتيك تمثل دورا مهما في الصناعة, هي عبارة عن كائنات مجهرية من فئة الغذائية و التي تلعب دورا حيويا في تخمر المواد الخام بما في ذلك النباتات. من بين الخضراوات المخمرة التي تحتل مكانة تاريخية الأهم و بلا منازع, الملفوف المخلل و الذي هو نتاج اللقاء بين التخمر اللاكتوي و نبتة الملفوف بوجه الخصوص.

تهدف دراستنا في المرحلة الأولى الى تحديد بكتيريا حامض اللاكتيك المسؤولة عن تخمر الملفوف, عزل و تحديد الخصائص المظهرية لخمائر حامض اللاكتيك للملفوف المخمر سمح لنا من الحصول على 54 سلالة موزعة على ثلاث أجناس : *Leuconostoc* (31,5%) , *Lactococcus* (33,3%) و *Lactobacillus* (33,4%). أظهرت دراسة التضاد الأثر التثبيطي للسلالات المعزولة تجاه *Staphylococcus aureus* 6538 و *Escherichia coli* مناطق تثبيط تتراوح بين 6 الى 17 مم.

في المرحلة الثانية من الدراسة , سمحت لنا التحاليل الكيميائية و البيو كيميائية بأن نستنتج أن طعامنا المخمر لديه قيمة غذائية جيدة التي تمكنه من أن يشكل مصدرا غنيا للكربوهيدرات (1,55 غ/100غ), البروتينات (0,75 غ/100غ), المعادن (1,66 غ/100غ), فيتامين "ج" (21 ملغ/100غ) و الألياف الغذائية (0,41 غ/100غ), و هو أيضا مصدر جيد لبكتيريا حمض اللاكتيك المعروفة على الحالة GRAS و التي يمكن أن تكون probiotiques.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا حامض اللاكتيك , الملفوف , الملفوف المخلل , الخصائص المظهرية , التضاد , القيمة الغذائية.

TABLES DES MATIERES

Remercîments

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction

1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

3

1. Bactéries lactiques.....	3
1.1. Propriétés générales.....	3
1.2. Classification.....	5
1.3. Principaux genres de bactéries lactiques.....	5
1.3.1. <i>Lactobacillus</i>	5
1.3.2. <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i>	7
1.3.3. <i>Lactococcus</i>	8
1.3.4. <i>Enterococcus</i>	9
1.3.5. <i>Streptococcus</i>	9
1.3.6. <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	10
1.3.7. <i>Aerococcus</i>	11
1.3.8. <i>Carnobacterium</i>	11
1.3.9. <i>Vagococcus</i>	11
1.4. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques.....	11
1.4.1. Acides organiques.....	12
1.4.2. Acides gras.....	12
1.4.3. Peroxyde d'hydrogène.....	13
1.4.4. Dioxyde de carbone.....	13
1.4.5. Diacétyl.....	14
1.4.6. Acétaldéhyde.....	14
1.4.7. Reutéline.....	14
1.4.8. Bactériocines.....	15
1.5. Intérêt des bactéries lactiques.....	16
1.5.1. Domaine Médical : les probiotiques.....	16
1.5.2. Domaine alimentaire.....	17
2. Chou.....	19
2.1. Famille de Brassicacées.....	19
2.2. Choucroute.....	19
2.2.1. Historique.....	21
2.2.2. Technologie de fabrication.....	22
2.2.2.1. Etapes préliminaires.....	22
2.2.2.2. Fermentation de choucroute.....	23

TABLES DES MATIERES

2.2.3. Effets bénéfiques des Fruits et légumes fermentés.....	25
2.2.3.1. Améliorer la qualité et la sécurité alimentaire.....	25
2.2.3.2. Élimination des composés antinutritionnels.....	26
2.2.3.3. Améliorer des services pour la santé des humains.....	26
2.2.3.4. Biopréservation.....	27
Chapitre II : Matériel et méthodes	28
1. Matériel.....	28
1.1. Source de chou.....	28
1.2. Milieux de culture.....	28
1.3. Souches de référence.....	29
2. Méthodes.....	29
2.1. Fabrication de choucroute.....	29
2.2. Isolement et purification.....	30
2.2.1. Préparation de l'échantillon.....	30
2.2.2. Purification des isolats.....	30
2.3. Conservation des isolats.....	30
2.4. Identification des souches.....	31
2.4.1. Critères morphologiques.....	31
2.4.1.1. Caractérisation macroscopique.....	31
2.4.1.2. Caractérisation microscopique.....	31
2.4.2. Critères physiologiques et biochimiques.....	32
2.4.2.1. Test de la catalase.....	32
2.4.2.2. Croissance à différentes températures et thermorésistance.....	33
2.4.2.3. Type fermentaire.....	33
2.4.2.4. Tolérance à la salinité et à l'acidité.....	33
2.4.2.5. Croissance sur le lait bleu de Sherman.....	33
2.4.2.6. Hydrolyse d'arginine.....	34
2.4.2.7. Test mannitol-mobilité.....	34
2.4.2.8. Production de dextrane.....	35
2.4.2.9. Production d'acétoïne.....	35
2.4.2.10. Utilisation de citrate.....	35
2.4.2.11. Hémolyse.....	35
2.4.2.12. Fermentation des hydrates de carbonés.....	36
2.5. Etude de l'activité antibactérienne des souches.....	36
2.5.1. Méthode de double couche.....	36
2.5.2. Méthode des puits.....	36
2.6. Détermination de la valeur nutritive du chou avant et après fermentation.....	37
2.6.1. Echantillonnage.....	37
2.6.2. Préparation des échantillons.....	37
2.6.3. Analyses chimiques.....	38
2.6.3.1. Potentiel d'hydrogène.....	38
2.6.3.2. Dosage de l'acidité totale titrable.....	38
2.6.4. Analyses biochimiques.....	39
2.6.4.1. Dosage de l'eau et des solides totaux.....	39
2.6.4.2. Dosage des cendres totales.....	40

TABLES DES MATIERES

2.6.4.3. Dosage des glucides.....	40
2.6.4.4. Dosage des protéines.....	41
2.6.4.5. Détermination des lipides.....	42
2.6.4.6. Détermination des fibres alimentaires.....	42
2.6.4.7. Dosage de l'acide ascorbique.....	42
2.6.4.8. Détermination de la valeur énergétique.....	43
2.6.5. Analyse statistique de résultats.....	44
Chapitre III : Résultats et Discussion	45
Première partie	45
1. Isolement.....	45
2. Identification.....	45
2.1. Examen macroscopique.....	45
2.2. Examen microscopique.....	45
2.3. Caractères physiologiques et biochimiques.....	45
2.3.1. Croissance à 15 et 45°C et la thermorésistante.....	47
2.3.2. Type de fermentaire.....	47
2.3.3. Tolérance à la salinité et à l'acidité.....	47
2.3.4. Croissance sur lait de Sherman.....	48
2.3.5. Test d'ADH.....	48
2.3.6. Test mannitol de mobilité.....	49
2.3.7. Production de dextrane.....	49
2.3.8. Production d'acétoïne.....	50
2.3.9. Utilisation de citrate.....	50
2.3.10. Fermentation des hydrates de carbones.....	54
2.4. Antibio résistance.....	56
2.5. Activité antibactérienne.....	58
Deuxième partie	64
2.6. Valeur nutritive du chou avant et après fermentation.....	64
2.6.1. Variations du pH et d'acidité au cours de fermentation.....	64
2.6.2. Analyses biochimiques et valeur nutritive du chou avant et après fermentation.....	65
Conclusion	70
Références bibliographiques	
Annexes	

A photograph of a field of green cabbages, viewed from an elevated angle. The cabbages are arranged in neat rows, and the background is slightly blurred. Overlaid on the image is the word "Intraaduction" in a green, cursive font, slanted diagonally from the bottom left towards the top right.

Intraaduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandus dans la nature, on les trouve dans le sol, sur les végétaux, elles jouent un rôle important sur la santé car elles constituent une fraction majeure de la flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.

Elles colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires. Elles sont depuis des siècles associées à l'alimentation humaine et animale. Ces micro-organismes sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Ce Sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales (Manas, 2014)

Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzi *et al.*, 2010).

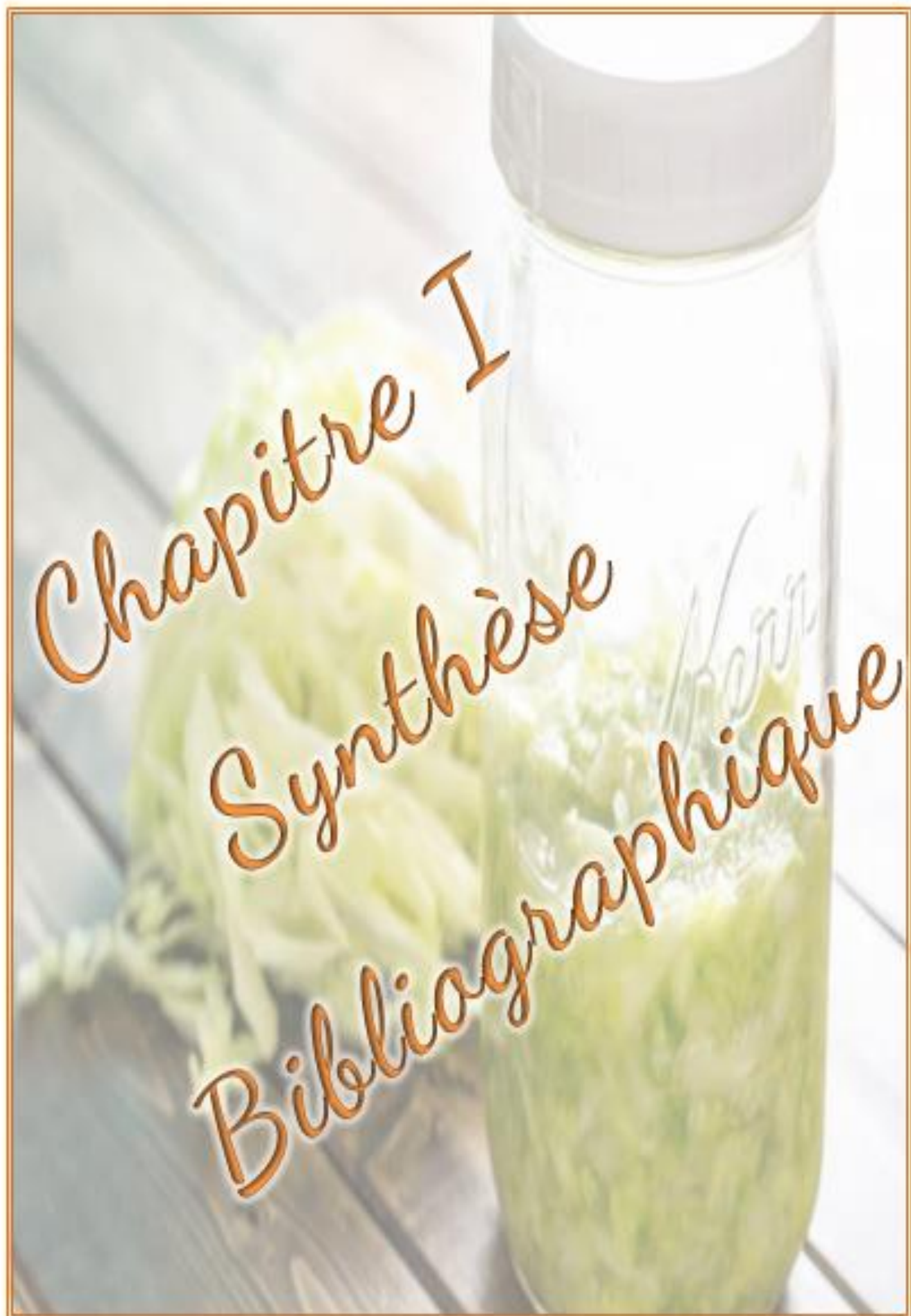
Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Ces bactéries assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire. Cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu. (Bekhouche et Boulahrouf, 2005).

La contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention d'aliments

sécurisés mais présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum. Ces techniques sont notamment basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à des souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices (Diep et Nes. 2002). Le légume fermenté qui a eu le sort historique le plus important est sans conteste est la choucroute, qui est le produit de la rencontre entre des techniques de fermentation et une plante particulière, le chou cabus

La choucroute est un produit à base de choux salés et fermentés. Le salage favorise les bactéries lactiques en inhibant de nombreux germes gênants. La fermentation est due, au départ à des ferments hétérolactiques *Leuconostoc mesenteroides*. Elle est poursuivie par *Lactobacillus plantarum*, puis par *Lactobacillus brevis* et enfin par *Lb. curvatus*, *sake*, ...etc. d'autres germes peuvent avoir une influence favorable s'ils restent en faible proportion, *Flavobacterium rhenans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, peuvent participer à l'élaboration d'arômes souhaitables (Guiraud, 2003). La fermentation des végétaux permet d'augmenter leur teneur en vitamines et notamment, dans le cas du chou, C'est aussi une bonne source de probiotiques qui enrichissent la flore intestinale et boostent l'immunité. C'est dans ce contexte que s'articule notre étude. Nous avons voulu mettre en place et pour la première fois en Algérie un produit local (la choucroute algérienne) issu d'une rencontre entre une forme de plante particulière, le chou, et une technique de fermentation naturelle et ceci grâce à des bactéries originelles présentes dans le chou dont les principales sont les bactéries lactiques. Les objectifs de ce travail sont :

- Mettre en place un aliment fermenté local à base de chou ;
- Caractériser la flore lactique caractéristique de deux fermentations dont le facteur variable est la température ;
- Etudier l'activité antibactérienne des souches identifiées ;
- Déterminer la valeur nutritionnelle de chou avant et après fermentation afin de monter en partie les vertus de notre aliment.



Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Bactéries lactiques

1.1. Propriétés générales

Avant le vingtième siècle, le terme bactéries (*Lacticacidbacteria*) a été utilisé pour signifier les organismes du lait acidifié (*Milk-souringorganisms*). Significativement, la première culture pure de ces bactéries était celle de *Bacteriumlactis* (probablement *Lactococcuslactis*) obtenu par Lister en 1873(Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont sous forme de coques ou de bâtonnets à Gram positifs, non sporulant, et produisent l'acide lactique comme produit final principal pendant la fermentation des carbohydrates (Kandler, 1983).

Les BL sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, homo fermentaires ou hétéro fermentaires. La voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas), ayant pour produit final principal l'acide lactique ou la voie 6-phosphogluconate / phosphokétolase (6-pg/pk) ayant pour résultats l'acide lactique, l'anhydride carbonique et l'éthanol (acide acétique)(Schleifer et Ludwig, 1995)(figure 1).

Cependant, quelques espèces sont considérées comme hétéro fermentaires facultatifs. Concernant la fermentation des hexoses, ces espèces sont homo fermentaires, mais dans certaines conditions (par exemple si la source disponible de carbone est un pentose), elles induisent la voie 6-pg/pk, ayant pour résultat la fermentation hétérolactique(Axelsson, 2004).

Lesbactéries lactiques sont trouvées dans divers niches écologiques, tel que le lait ainsi que certaines nourritures, la bouche, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (Lopez-Diaz et *al.*, 2000).Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (Carr *etal.*, 2002). Même si elles se développent dans une variété d'habitats,elles exigent des carbohydrates fermenticibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leur croissance (Björkroth et Holzapfel, 2003).

Les souches sont généralement faiblement protéolytiques et lipolytiques et exigent des acides aminés, des purines, des pyrimidines et des vitamines pour leur croissance (Jay, 1996).

Les bactéries lactiques utilisées dans les fermentations laitières peuvent être divisées en deux groupes sur la base de leur croissance optimale (Bissonnette *etal.*,2000). Les bactéries

mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C et les thermophiles entre 30°C et 45°C. Alors que la majorité de souches se développent à pH 4,0-4,5, certaines sont en activité à pH 9,6, d'autres à pH 9,6 et d'autres à pH 3,2 (Jozala et al.,2005). L'acide lactique produit peut-être sous deux formes stéréoisomériques, L moins fréquemment, D ou un mélange des deux (Who, 1974)

Bifide HomofermentaireHétérofermentaire

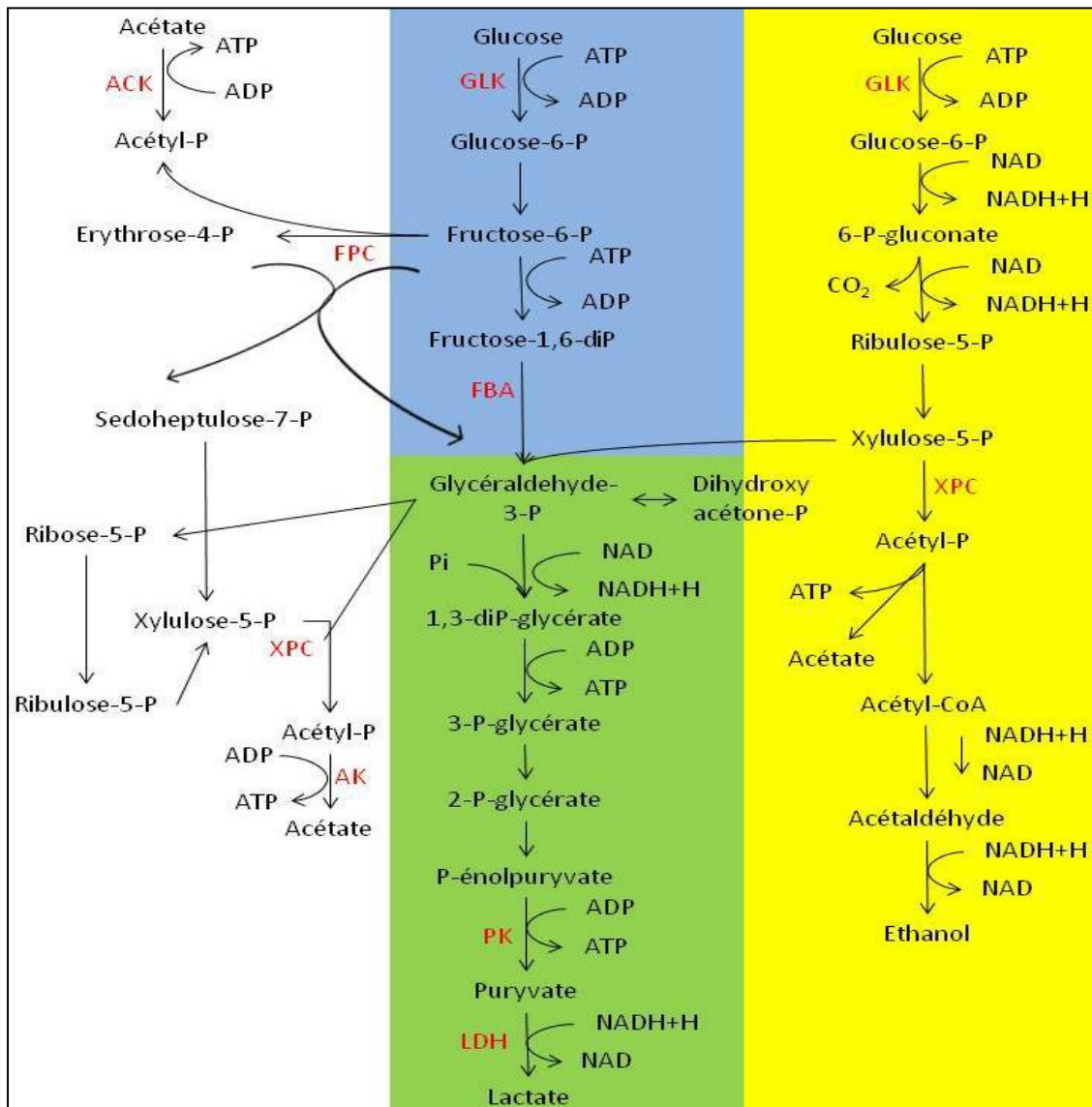


Figure 1:Voies homofermentaire, hétérofermentaire ou bifide de la dégradation du glucose(Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

(Les principales enzymes sont indiquées en rouge. GLK : glucokinase, FBA : FBP aldolase, FCP : fructose-6-phosphate phosphocétolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ACK : acétate kinase)

1.2. Classification

Décrite pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX^{ème} siècle (1919), les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique (Lahtinem *et al.*, 2012).

La monographie d'Orla-Jensen, (1919) a constitué la base de la classification actuelle des bactéries lactiques. Les critères utilisés (morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres) sont toujours très importants pour la classification des bactéries lactiques, bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont considérablement augmenté le nombre de genres de bactéries lactiques à partir des quatre initialement reconnue par Orla-Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) (Lahtinem *et al.*, 2012).

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques (du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments) mais il est phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières (Vandamme *et al.*, 1996).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées du point de vu morphologique en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella* est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Ho *et al.*, 2007).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology*, (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres (*Aerococcus*, *Alliococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*,)(Pot, 2008) répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont importants d'un point de vue biotechnologique (Axelsson, 2004 ; Guiraud *et al.*, 2003).

1.3. Principaux genres de bactéries lactiques

1.3.1. *Lactobacillus*

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*. Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae, il comprend

actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont constituées de 18 sous-espèces (Zhang et Cai, 2014).

Il est également très hétérogène, englobent les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimique et physiologique. L'hétérogénéité se traduit par la gamme du pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. Cette gamme est de 32 à 55% (Zhang et Cai, 2014).

Nombreuses d'entre elles sont des agents de fermentation lactique intervenant dans des nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (Dworkin *et al.*, 2006). Ils sont immobiles, asporulés et catalase négative. On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles,...) et de longueur. La longueur des bacilles et le degré de courbure dépend de l'âge de la culture, la composition du milieu (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique) et le taux d'oxygène.

Cependant, les principales différences morphologiques entre les espèces restent habituellement clairement reconnaissables. Certaines espèces de lactobacilles produisant du gaz (par exemple, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus brevis*) présentent toujours un mélange de bacilles longs et courts (De Vos *et al.*, 2009).

La division cellulaire se produit seulement sur un seul plan. La tendance à former des chaînettes varie selon les espèces et même des souches, ceci dépend de la phase de croissance et le pH du milieu (Zhang et Cai, 2014 ; De Vos *et al.*, 2009).

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53°C, avec un optimum entre 30 et 40°C (De Vos *et al.*, 2009).

Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5,5 à 6,2 (Zhang et Cai, 2014).

À l'origine, les espèces de genre *Lactobacillus* ont été regroupés en fonction de leur température de croissance et leur capacité à fermenter les hexoses, et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire.

Orla-Jensen, (1919) a subdivisé ce groupe d'une manière similaire à celle des coques lactiques. Ainsi, les sous-genres de *Lactobacillus* ont été créés : *Thermobacterium*,



Streptobacterium, et *Betabacterium*. Remarquablement, cette division est toujours valide à un degré considérable, bien que les désignations aient été abandonnées et quelques modifications dans les définitions des sous-groupes ont été faites (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen *et al.*, 2004).

- **Groupe I** : formé des lactobacilles homofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium* ne produisant presque exclusivement que de l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses par glycolyse. Ils ne peuvent fermenter ni les pentoses ni les gluconates.
- **Groupe II** : formés de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium* et qui fermentent les hexoses en acide lactique par glycolyse, et peuvent fermenter les pentoses en acide lactique et en acide acétique grâce à une phosphocetolase inductible. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du gluconate
- **Groupe III** : formé de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Betabacterium*, qui fermentent les hexoses en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocetolase), et qui fermentent les pentoses en acide lactique et acide acétique (voie hétéro fermentative de la glycéraldéhyde-3-Phosphate/pyruvate Kinase/lactate déshydrogénase) (Zhang et Cai, 2014 ; Salminen *et al.*, 2004).

Cette classification est la seule reconnue, bien qu'elle soit imparfaite car le séquençage de l'ADNr 16S et le contenu en GC % qui varie énormément d'une espèce à une autre (32 à 53%) et l'absence d'homologie ADN-ADN significative entre beaucoup d'espèces, sont aussi le reflet d'une parente phylogénique éloignée (Hydersah, 2010).

1.3.2. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires et en chainettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol ou acétate. Les caractéristiques telles l'hydrolyse de l'esculine la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation de citrate et/ou malate permettant la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella*(Ho *et al.*,2007).

- ***Leuconostoc*** : Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries. Les *Leuconostocs* responsables de ces accidents produisent du dextrane en milieu saccharosé (entourées d'une gaine comme celle des *Nostoc*) (Zarour, 2010).

Leuconostoc fallax est un *Leuconostoc* atypique isolé de choucroute, qui a été découvert par Martinez-Murcia et al., (1991); par la suite, des variétés de la souche de *Leuconostoc fallax* ont été isolés de choucroute fermentée (Zhang et Cai, 2014).

Elles sont exigeantes du point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Leur optimum de croissance est de 20 à 30°C (Bjorkroth et al., 2006).

Les *Leuconostocs* principalement *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Leuconostoc lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et du CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hadeif, 2012).

- ***Weissella*** : Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont généralement immobiles. Cependant, une nouvelle espèce mobile avec flagelles péritriches, *Weissella beninensis*, a récemment été décrite par Padonou et al., (2010). Les espèces du genre *Weissella* sont connues pour produire divers exopolysaccharides (EPS) (Lahtinem et al., 2012).

- ***Oenococcus*** : Ce sont des bactéries immobiles, asporulés de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles poussant à un pH initial de 4,8. Elles ont pour habitat le vin ; par conséquent, elles tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (Björkroth et Holzappel, 2006 ; Zhang et Cai, 2014).

1.3.3. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils

sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et *al.*, 2005). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable.

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique seul *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C ; certaines espèces peuvent pousser à des températures aussi basses que 7°C lors d'une incubation prolongée de 10 à 14 jours.

Les cultures se développent typiquement dans 4,0% de NaCl; Toutefois, *Lc. Lactis* subsp. *Cremoris* ne tolère que 2,0% de NaCl, qui semble être la seule exception connue. Les Lactocoques poussent mieux à des valeurs de pH quasi-neutre et cessent de croître à un pH d'environ 4,5 (Salminen et *al.*,2004 ;Lahtinem et *al.*,2012 ;Zhang et Cai, 2014).

Elles ne poussent pas au pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl. Excepté l'espèce *Lactococcus garvieae*, elles ne sont pas hémolytiques (Alomar, 2007). Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

1.3.4. *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C (Tamime, 2002 ; Ho *etal.*, 2007).

Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *E. faecalis* et les espèces proches. Généralement les espèces sont différenciées par la fermentation de l'arabinose et du sorbitol (Tamime, 2002 ; Ho et *al.*,2007).

1.3.5. *Streptococcus*

Streptococcus thermophilus est la seule espèce non pathogène du genre *Streptococcus*, appartenant au groupe des bactéries ayant un intérêt industriel et nutritionnel reconnu sous le nom GRAS (Hols et *al.*, 2005).



Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Pilet *et al.*, 2005).

S. thermophilus est l'une des bactéries lactiques thermophiles, largement employée en tant que levain dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés tel que le yaourt (en culture mixte avec *Lb. bulgaricus*) et les fromages à pâte cuite (en culture mixte avec *Lb. helveticus*), notamment la Mozzarella (Hols *et al.*, 2005 ; Delorme, 2008). Elle est connue par une forte production d'arôme tel que l'acétaldéhyde, et par sa capacité de produire de l'acide folique et des exopolysaccharides (Delorme, 2008). Cette espèce est caractérisée par l'utilisation du glucose seul à partir du lactose, ayant pour résultat des produits fermentés contenant du galactose résiduel (Hols *et al.*, 2005).

S. thermophilus possède un pourcentage en G+C' (37-40%) proche de celui des entérocoques et des lactocoques. Des études moléculaires portant sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont démontré que *S. thermophilus* est une espèce très distincte des *S. salivarius* et des entérocoques (Delorme, 2008).

1.3.6. *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés, dont la particularité est le regroupement en tétrade ou une division dans les deux directions perpendiculaires. Ainsi, ils ne forment jamais de chaînes typiques des autres genres de coques : *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, qui forment des chaînes en raison de la division dans un seul plan. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs très élevées en sels, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet *et al.*, 2005).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont mésophiles, leur métabolisme est homofermentaire, ne produisant pas de CO₂ à partir du glucose, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Pousse à un pH de 5 mais ne pousse pas à 9. Leur température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Ils ne sont pas en mesure de réduire le nitrate (Holzapfel *et al.*, 2009 ; Lahtinen *et al.*, 2012).

La position phylogénétique du genre *Pediococcus* a été établie à l'aide de l'analyse de l'ARNr 16S et a montré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont étroitement liés (Holzapfel et al., 2009 ; Lahtinen et al., 2012).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les *Pediococcus* sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud, 2003).

1.3.7. *Aerococcus*

Les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), immobiles, anaérobies facultatifs, catalase-négative, oxydase négative, α-hémolytiques, homofermentaires, arginine⁻, pouvant croître à une concentration de 6,5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle (Collins, 2009).

1.3.8. *Carnobacterium*

Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 mais pas à 4,5, incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase⁺ en présence d'hème (Hammes et Hertel, 2006).

1.3.9. *Vagococcus*

Les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais pas à 45°C, homofermentaires et ADH⁻ (Collins, 2009).

1.4. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques

Les mécanismes antimicrobiens spécifiques des bactéries lactiques exploitées dans la biopréservation des nourritures incluent la production des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, de l'anhydride carbonique, du diacétyle, des antimicrobiens à large spectre tels

que la reutéline et la production de bactériocines (Jacobsen *et al.*, 2003) pendant les fermentations lactiques (Deegan *et al.*, 2006).

Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes ; contaminants possibles des produits fermentés (Guessas *et al.*, 2006).

1.4.1. Acides organiques

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme dissociée et non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport (Parente *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié à un certain pH semblable avec l'acide lactique. Les acides acétiques et propioniques agissent l'un sur l'autre sur les membranes de cellules pour neutraliser le gradient électrochimique de proton, mais l'effet de l'acide acétique et propioniques dépend souvent de la diminution du pH provoqué par l'acide lactique (Eklund, 1989).

L'acide propionique réduit la croissance fongique, particulièrement à un pH inférieur, et affecte les membranes fongiques aux valeurs de pH en dessous de 4,5. L'acide propionique et acétique empêchent également l'assimilation d'acide aminé (Eklund, 1989).

De toute façon, les effets inhibiteurs des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique et propionique continueront à compliquer des études sur des effets antimicrobiens des bactéries lactiques, à moins que d'autre purification et caractérisation rigoureuses des substances soit appliquée (Magnusson *et al.*, 2003).

1.4 .2.Acides gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao *et al.*, 1984) et des saucisses sèches (Sanz *et al.*, 1988).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram⁺, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

1.4.3. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène sous l'action de la flavoprotéine oxydase du nicotinamide adénine hydroxyperoxydase dinucléotide (NADH). L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane ; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (Kong et Davison, 1980).

H₂O₂ peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxide (O₂⁻) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN. La production de H₂O₂ par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas sp.* et de divers microorganismes psychrotrophes (Davidson et al., 1983). L'inhibition est négociée par l'effet d'oxydation fort sur des lipides de membrane et des protéines cellulaires. La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et la disponibilité de l'oxygène (Helander et al., 1997).

1.4.4 .Dioxyde de carbone

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1989). Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram⁻ (Farber, 1991).

Le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg, 1989), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

1.4.5. Diacétyle

Il est produit par des souches de *Lc. Lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* par la fermentation du citrate (Lindgren et Dobrogosz, 1990). Il est responsable de l'arôme et de la saveur du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyle sont de 2 à 7 µg/ml (Earnshaw, 1992).

Plusieurs bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyle bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan, 1986). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée.

Le diacétyle a été démontré pour être un antimicrobien efficace contre un éventail de bactéries Gram négatives et Gram positives, bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (Gill et Halley, 2003). Les quantités de diacétyle produites par *Lc. Lactis* subsp. *Lactis* bio var. *Diacetylactis* varient de 0,07 à 3,72 ppm (Burrow *et al.*, 1970).

1.4.6. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers, les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (Bottazzi et Dellaglio, 1967).

La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (Kulshrestha et Marth, 1974).

1.4.7. Reutéline

La reutéline est produite par *Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson *et al.*, 1989). La reutéline est formée pendant la croissance anaérobie de *Lb. reuteri* par l'action de la glycérol déshydrogénase qui catalyse la conversion du glycérol en reutéline (Talarico *et al.*, 1988).

La reutérine montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. Les organismes de détérioration sensibles à la reutérine comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* (Axelsson et al., 1989).

1.4.8. Bactériocines

Le terme "bactériocine" a été inventé en 1953 pour définir la colicine produite par *Escherichia coli*. Comme les bactéries lactiques, bactériocines ont été consommés depuis des millénaires par l'humanité comme produits des bactéries lactiques et, pour cette raison, ils peuvent être considérés comme ingrédients alimentaires naturels comme rapporté par (Garneau et al., 2002)

Les bactériocines peuvent être utilisées pour conférer une forme rudimentaire d'immunité innée aux aliments. Les bactériocines sont des peptides ribosomiaux de masse moléculaire faible, synthétisés, libérés de manière extracellulaire ou des protéines (habituellement 30-60 acides aminés), qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres bactéries, soit dans la même espèce (spectre étroit) ou à travers les genres (large spectre). La production de bactériocine a été trouvée chez nombreuses espèces de bactéries parmi lesquelles, en raison de leur statut « généralement reconnu comme sûr » (GRAS), les bactéries lactiques ont suscité un grand intérêt en termes de sécurité alimentaire (Manas et al., 2014)

En fait, les bactériocines des bactéries lactiques bénéficient la qualité alimentaire et cela offre aux scientifiques de l'alimentation la possibilité de permettre le développement de la flore dans les aliments fermentés ou empêcher le développement des bactéries non désirées spécifiques (altération et pathogènes) dans les deux les aliments fermentés et non fermentés en utilisant respectivement une bactériocine à gamme étroite d'hôtes (Aasen et al., 2003)

Au cours des deux dernières décennies, la sécurité alimentaire est devenue un problème majeur, et de grands efforts ont été fournis pour identifier des bactériocines qui inhibent la croissance des germes pathogènes et nuisibles (Fox et al., 2000).

1.5. Intérêt des bactéries lactiques

1.5.1. Domaine Médical : les probiotiques

Ce sont Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries (Lilly et Stillwell, 1965), l'expression « probiotique » dérive de deux mots grecs, « pro » et « bios » qui signifient en faveur de la vie, ce sont des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale.

Chez les animaux d'élevage, ces produits favorisant le mécanisme biologique naturel peuvent être une bonne alternative à l'emploi des antibiotiques qui ont été longtemps utilisés pour améliorer les performances zootechniques et sanitaires de ces animaux mais dont l'une des conséquences néfastes a été l'apparition de l'antibiorésistance. (Lilly et Stillwell, 1965)

Chez l'homme, ces bactéries jouent un rôle inhibiteur contre les bactéries pathogènes et améliorent la digestion. L'effet bénéfique est dû à plusieurs mécanismes (Larparent, 1997) :

- ❖ La production d'acides organiques (acide lactique, acétique), de peroxyde d'hydrogène, et de bactériocines limitent le développement des entérobactéries.
- ❖ Certaines souches ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires qui sont alors plus inhibiteurs sur le développement des bactéries pathogènes que les formes conjuguées.
- ❖ Les souches peuvent inhiber l'implantation des germes pathogènes par compétition.
- ❖ Pour l'adhésion aux cellules intestinales, ce qui permet une colonisation rapide et dirigée du tube digestif.
- ❖ Ces bactéries peuvent réduire l'absorption de substances toxiques (ammoniac, amines, indole) et peuvent ainsi diminuer les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques.
- ❖ Les probiotiques peuvent également produire des métabolites susceptibles de neutraliser « *in situ* » certaines toxines bactériennes.
- ❖ Les probiotiques peuvent stimuler l'activité enzymatique de micro-organismes endogènes permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments.
- ❖ Ils peuvent stimuler les cellules du système immunitaire et favoriser la production d'anticorps qui inhibent ainsi les bactéries pathogènes à la surface des muqueuses intestinales.

- ❖ Certaines souches peuvent posséder une activité anti-cancérogène dont les propriétés peuvent se répartir en deux catégories :
 - 1- La prévention de l'initiation d'un cancer, soit en détruisant des substances pré-cancérogènes présentes dans l'organisme, soit en inhibant les bactéries présentes dans le tractus digestif, productrices d'enzymes catalysant la conversion de substances cancérogènes.
 - 2- La suppression de cellules tumorales, soit directement, soit de façon indirecte, en favorisant l'activité des macrophages qui sont impliqués dans la destruction des cellules tumorales.
- ❖ Les Lactobacilles excrètent la bêta-galactosidase, souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilite donc la digestion du lactose

1.5.2. Domaine alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettant la conversion d'une grande variété de matière premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins sont des exemples de transformation de matières première d'origine végétale. Ils sont aussi utilisés en boulangerie traditionnelle (Axelsson, 2004).

Tableau 1: Principales utilisations des bactéries lactiques en agroalimentaires (Caplice et Fitzgerald, 1999)

Produits	Pays	Microorganismes	Substrats
Pain			
Pain	International	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , autres levures, et BL.	Blé, riz et autres céréales
	San Francisco	<i>Lb. sanfrancisco</i>	Farine de blé
Produits laitiers			
Fromages	International	<i>Lc. Lactis</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. shermanii</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Penicillium spp.</i>	Lait de vache, chèvre, ou brebis
Lait fermenté		<i>Lb. acidophilus</i>	Lait de vache
Cheddar		<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i>	Lait
Suisse		<i>Lb (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>	Lait
Yoghourt	Internationale	<i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i>	Lait
Kéfir		<i>Lactococcus</i> , <i>Levure</i> , <i>Lb. Kefir</i>	Lait de vache de jument ou de chèvre

Produits végétaux			
Bongkrek	Indonésie	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Noix de coco
Gari	Afrique de l'ouest	<i>Corynebacterium manihot</i> , autres levures, et <i>BL(Lb. plantarum, Streptococcus spp.)</i>	Racines de manioc
Idli	Sud de l'Inde	<i>BL, (Ln. mesenteroïdes, E.faecalis) Turulopsis, Candida, Trichosporon pullulans</i>	Riz et black gram dhal
Kenkey	Ghana	Inconnu	Maïs
Kimchi	Corée	<i>BL</i>	Choux, végétaux, noix
Mahewu	Afrique du sud	<i>BL</i>	Maïs
Ogi	Nigeria	<i>BL, Cephalosporium, Fusarium, Aspergillus, Penicillium spp., Saccharomyces cerevisiae, Candida mycoderma, C.valida, ou C.vini</i>	Maïs
Sauce de soja	Japon, Chine, philippines	<i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>A.soyae</i> , <i>Lactobacillus, Zygosaccharomyces rouxii</i>	Soja et blé
Tempeh	Indonésie	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soja
Nan	Inde	<i>Saccharomyces cerevisiae, BL</i>	Farine
Olives	Méditerranée	<i>Ln. mesenteroïdes,</i>	Olives vertes
		<i>Lb.plantarum</i>	
Choucroute	Europe	<i>Lc. Lactis, Ln. mesenteroïdes,</i>	Choux
		<i>Lb.(brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>	
Sauce de soja		<i>Lactobacillus sp., Aspergillus oryzae et soyae Zygosaccharomyces rouxii</i>	Soja et blé
Légumes		<i>Enterococcus (mundtii, faecium) Lactococcus (cremoris, lactis)</i>	Légumes
Pickles		<i>Pediococcus, Lb plantarum</i>	Concombres
Bière		<i>Saccharomyces cerevisiae, BL</i>	Orge, houblon
Vin		<i>Oenococcus oenos</i>	Raisin
Sake		<i>Lb sake, Lb homohiochi, Ln. mesenteroïdes</i>	Riz
Produits carnés et de la pêche			
Viandes et saucisses fermentées	Europe (sud et centre, U.S.A)	<i>BL (Lactobacillus, Pediococcus) Staphylococcus, autre BL</i>	Viandes de bœuf et volailles
Poissons		<i>Lb.(plantarum, casie), Cb.(piscicola, et divergens)</i>	Poisson
Izushi	Asie	<i>Ln. mesenteroïdes, Lb. plantarum</i>	Poisson, riz, légumes

2. Chou

2.1.Famille de Brassicacées

Les Brassicacées anciennement nommées crucifères, sont une importante famille de plantes dicotylédones et essentiellement herbacées. Ce sont des plantes représentées dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elles sont facilement cultivables quel que soit les différentes conditions climatiques. Selon les variétés, les températures de culture sont comprises entre 4°C et 30°C. Ainsi, les crucifères peuplent la majorité des biotopes terrestres possibles : sables et roches maritimes, bords de ruisseaux, talus calcaires, pelouses humides ou sèches, bords de chemins, cailloutis et prairies de montagne etc.... Ces plantes peuvent être cultivées dans les jardins et les champs comme plantes ornementales (monnaie-du-pape) ou alimentaires (chou, brocoli etc....)(Adjélé Eli Wilson, 2011).

Le nom latin de *Brassica* serait dérivé d'un mot celte, *bresic*, qui veut dire « chou », alors qu'*oleracea* veut dire potager. Le terme « chou », vient de latin *caulis*. Les types de choux que l'on consomme habituellement en occident viennent tous d'un ancêtre sauvage unique, *B.oleracea var oleracea* (tableau 1). D'autres pensent qu'il y aurait eu un ancêtre beaucoup plus ancien qui était déjà cultivé il y a 8000 ans sur les côtes de nord de l'Europe. Cet ancêtre sauvage, aujourd'hui disparu, aurait été introduit dans les pays de bassin méditerranéen, en Europe de l'Est et même au Proche-Orient. Au fil des siècles, *B.oleracea* a donné naissance à des sous espèces présentant des caractéristiques diverses selon qu'on ait voulu développer les fleurs (brocoli, chou-fleur), les feuilles formant la pomme (chou de Milan ou chou de Savoie, chou blanc, chou rouge, choux de Bruxelles), ou la tige (chou-rave). Chacune de ces variétés créées a donné lieu à l'apparition de spécialités culinaires locales (Naska,2005).

Tableau 2 : principaux légumes crucifères consommables(Adjélé Eli Wilson, 2011).

Genre	Espèce et variétés	Nom commun
	<i>B.oleracea var.botritys</i>	Chou-fleur
	<i>B.oleracea var.capitata</i>	Chou blanc
	<i>B.oleracea var.gemmifera</i>	Chou de Bruxelles
<i>Brassica</i>	<i>B.oleracea var. gengyloides</i>	Chou rave
	<i>B.oleracea var. italica</i>	Brocoli
	<i>B.oleracea var.rubra</i>	Chou rouge
	<i>B.oleracea var. sabauda</i>	Chou de milan
	<i>B.oleracea var. sabellica</i>	Chou frisé
	<i>B.rapa var.chinensis</i>	Chou chinois
	<i>B.rapa var.oleifera</i>	Navette
<i>Brassica</i>	<i>B.rapa var.rapa</i>	Navet
	<i>B.napus var.oleifera</i>	Graine de colza
	<i>B.alba</i>	Graine de moutarde blanche
	<i>B.nigra</i>	Graine de moutarde noire
<i>Raphanus</i>	<i>R.sativus</i>	Radis
<i>Armoracia</i>	<i>A.rusticana</i>	Raifort
<i>Nasturtium</i>	<i>N.officinalis</i>	Cresson de fontaine
<i>Eruca</i>	<i>Vesicaria</i>	Roquette
<i>Wasabia</i>	<i>W.japonica</i>	Wasabi

Il existe différentes catégories de choux(figure 2), en fonction de la forme de la pomme, partie centrale comestible du chou. On retrouve des choux ayant des pommes coniques rondes, arrondies et aplaties ou aplaties. La pomme est séparée par des entre-nœuds courts, donnant à la plante un port bas. De ce fait, le rendement utile de la plante (partie commercialisable et consommable) est très élevé (60 à 70 %). Seules les racines, une partie de la tige et quelques feuilles externes (moins pommées et souillées) ne sont pas consommées. Les choux sont pour l'essentiel commercialisés à l'état frais et entier, pour être crus ou après cuisson. Une partie de la production (20 à 25 %) est destinée à des transformations industrielles, la plus courante est la production de choucroute (Pitrat, 2003).

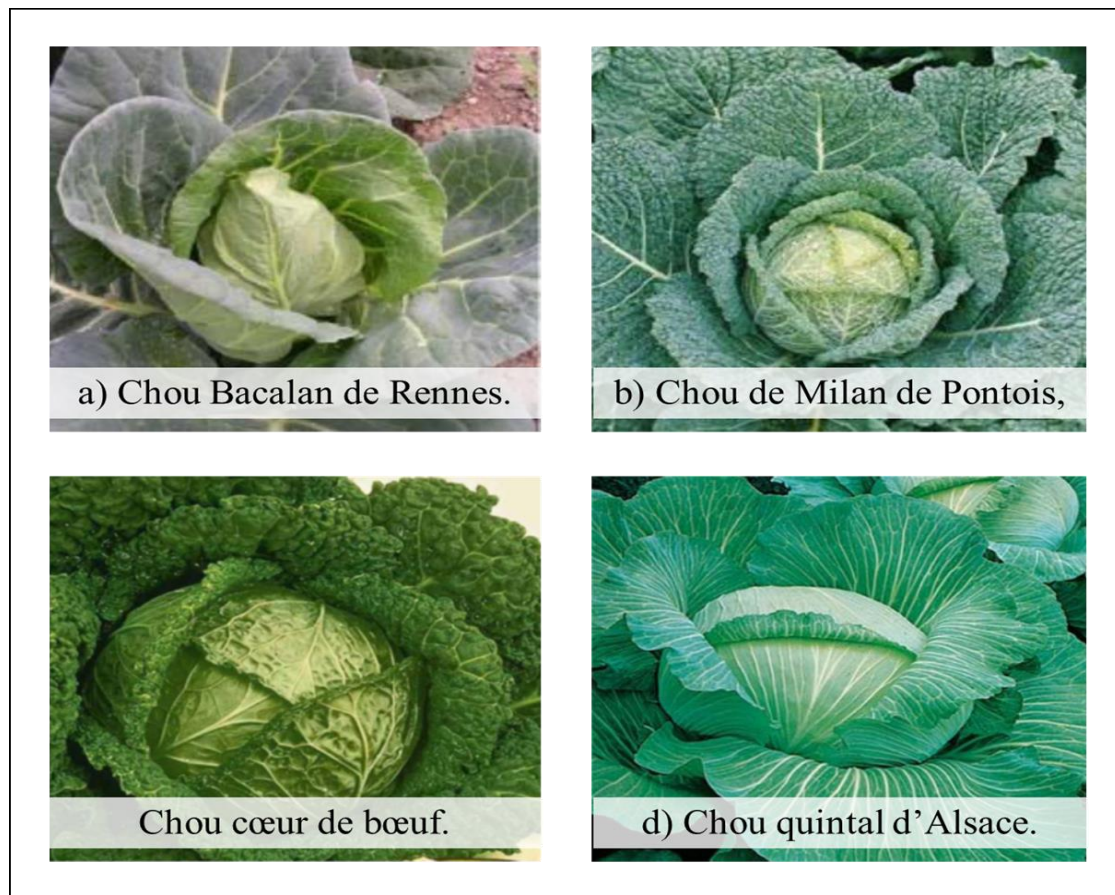


Figure 2 :différentes catégories de choux

2.2.Choucroute

2.2.1. Historique

Le mot « choucroute » dérive de l'allemand « sauerkraut » qui signifie « chou acide ». L'histoire a voulu que ce soit l'Alsace qui donne son nom à la choucroute. En effet, une dérive a abouti au mot « Sürkrüt » qui signifie littéralement herbe aigre (« sür » pour aigre et « krüt » pour herbe). (Guignard, 2004).

Il semblerait que la choucroute ait des origines chinoises et qu'elle fût la nourriture de base des constructeurs de la « Muraille de Chine ». En effet, la légende raconte qu'au III^{ème} siècle av. J.C., les Chinois ont découvert le chou fermenté d'une manière fortuite. Lors d'un hiver glacial. Les ouvriers ont dû se mettre à l'abri dans la plaine et laissèrent le chantier et la nourriture sous la neige. A leur retour. Ils dégustèrent les choux au goût aigre car, à l'abri de l'air sous la neige, ils avaient fermenté. Par la suite, ce seraient les grands voyageurs, comme Marco Polo, qui nous auraient apporté la choucroute(Farnworth, 2005).

Quant aux allemands, ils l'ont découverte à l'occasion des invasions Mongoles et Tartares. Et au XVI^{ème} siècle, ils ont mis au point le procédé de fermentation en présence de sel, ce qui a permis d'étendre cet aliment aux contrées voisines comme l'Alsace. C'est cette dernière qui en fit sa réputation et son épanouissement puisque la choucroute devient un plat régional traditionnel. Ce qui a fait de l'Alsace, la 1^{ère} région française productrice de chou à choucroute. Approximativement à la fin du siècle dernier, du fait du développement des transports entre autres, la choucroute s'est répandue en France et est passée de « Paysanne » à « Bourgeoise » par son opulence, sa gastronomie mais également par sa présence sur les table de fête(Farnworth, 2005).

Aujourd'hui, la fabrication de choucroute est une industrie importante qui se sert de la dernière connaissance dans la technologie de fermentation et la microbiologie. Cette nourriture est devenue populaire aux États-Unis et aux pays européens divers.

La choucroute Actuelle est un produit résultant de la fermentation d'acide lactique de chou blanc râpé, salé (*Brassica oleracea var. capitata. L alba*). Il n'y a aucun doute que la conservation de matériel d'usine par la fermentation date de temps préhistoriques. Plinius l'Aîné, au premier siècle a p J.-C., dit pour avoir été le premier à décrire la production de choucroute par la conservation de chou de sel prétendu dans des navires de terre. Il peut être assumé que dans les conditions décrites, le chou a été fermenté par des micro-organismes, dont certains étaient typiquement associés à l'usine phylloplane, mais dont la majeure partie a été située dans les pores des navires de fermentation et /ou est provenue d'une ancienne fermentation(Eichholtz, 1975).

2.2.2. Technologie de fabrication

2.2.2.1. Etapes préliminaires

Le processus débute par la récolte des choux et une série d'opérations précède la fermentation(Adjélé Eli Wilson, 2011) :

- ❖ **L'approvisionnement** en chou : trémie, tapis roulant ou élévateur.
- ❖ **L'étrognage** : les choux arrivent sur un tapis à alvéoles présentant le trognon sur la face supérieure, et les étrogneuses (vrille en rotation) s'abaissent et extraient la partie fibreuse et cellulosique.
- ❖ **L'effeuillage** : les choux tombent sur des jeux de rouleaux effeuilleurs qui enlèvent les feuilles n'adhérant pas à la pomme.

- ❖ **Le parage** : c'est l'étape de contrôles (matière sèche, teneur en sucre, concentration en nitrate,...) et de finitions.
- ❖ **La coupe** : les choux entraînés par les lobes de retenue tournants, sont émincés en fines et longues lanières d'une épaisseur moyenne de 0,75 mm par des couteaux inox multilames.
- ❖ **Le salage** : cette étape correspond à la répartition homogène du sel avec une concentration allant de 1,5% à 2,5% en poids. Certains choucroutiers utilisent le sel marin. Le sel a pour but de provoquer un déséquilibre osmotique conduisant à la perte d'eau et d'éléments nutritifs des feuilles qui sont nécessaires aux microorganismes de la fermentation.
- ❖ **L'encuvage** : les lanières sont aiguillées vers une cuve de stockage et de fermentation jusqu'à la remplir complètement. Le tassage accélère l'exsudation du suc du parenchyme végétal et l'élimination de l'air occlus, permettant ainsi d'obtenir plus rapidement l'anaérobiose nécessaire à la fermentation. La cuve est couverte avec une bâche à eau surmontée de bloc de béton de 20 cm d'épaisseur. La bâche empêche la pénétration de l'oxygène atmosphérique qui pourrait nuire à la prolifération de la flore anaérobie lactique et le bloc de béton permet d'appliquer une pression qui favorise la fermentation. Les cuves ont des capacités variables (7 à 100 tonnes) et sont faites habituellement aujourd'hui en fibre de verre (matériel pouvant facilement être aseptisé).

2.2.2.2. Fermentation de choucroute

C'est en 1930, que Pederson identifie les microorganismes responsables de la fermentation de la choucroute. Il existe 3 espèces principales qui sont successivement présentes dans le milieu durant le processus de fermentation : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, et *Lactobacillus brevis*. Cette flore est naturellement présente à la surface des feuilles internes du chou à une concentration de l'ordre de 4 000 bactéries/g.

La fermentation débute à 18°C avec une succession d'étapes dès la coupe et le remplissage des cuves. La flore aérobie (les *coliformes* et *Pseudomonas*) utilise l'ensemble de l'oxygène présent dans la cuve. Au bout de 2 jours, cette flore disparaît et simultanément, *Leuconostoc mesenteroides*, bactéries hétérofermentaire convertit les différents sucres contenus dans les cellules végétales (glucose, fructose, saccharose) en différents métabolites

(acide lactique, acide acétique, mannitol, dextrane, éthanol, et gaz carbonique). Le CO₂ chasse l'O₂ résiduel, et on observe simultanément une diminution du pH (Farnworth, 2005).

La flore aérobie ne peut plus se développer. C'est à partir d'une acidité totale de 1% que *Leuconostoc mesenteroides* est remplacé par *Lactobacillus plantarum*. Cette flore homofermentaire élimine le goût amer de la choucroute et transforme le dextrane et le mannitol. Cette étape aboutit à une acidité de 1,5 à 1,9%. Et pour terminer cette succession d'action de microorganismes, *Lactobacillus brevis*, bactérie hétérofermentaire qui résiste à l'acidité transforme les sucres restants et amène le pH à une valeur de 3,60 soit 2,5 % d'acidité (Stamer, 1971).

Durant la fermentation, on effectue une opération dénommée « débondage » qui consiste à enlever le jus de fermentation. L'opération est tous 3-4 jours jusqu'à ce que la saumure soit claire et limpide. Ce procédé dure 3 semaines environ et la saumure est remplacée par une nouvelle solution saline. Au bout de 1 mois de fermentation, la choucroute est « consommable », néanmoins il est préférable, pour profiter de toutes ses qualités organoleptiques, de prolonger celle-ci jusqu'à 2 mois. Le rendement (rapport entre la masse de choucroute recueillie et la masse de choux épluchés utilisés) est de l'ordre de 1/3 du poids des choux épluchés. Plusieurs paramètres peuvent influencer la qualité de choucroute (Tolonon, 2004)

- ❖ **L'anaérobiose** est indispensable pour le développement des bactéries lactiques, les autres bactéries sont inhibées. Elle permet d'éviter l'altération du chou par oxydation et d'éviter la synthèse de produits secondaires indésirables qui altèrent le goût et l'odeur du chou. C'est pourquoi, on veille à ce que le chou soit toujours recouvert par son jus.
- ❖ **La température** de fermentation de 18°C permet l'obtention d'une bonne qualité organoleptique et une fermentation rapide et rend aussi la commercialisation possible en 3 semaines.
- ❖ **La concentration en sel** permet d'extraire, par l'intermédiaire de l'eau, les substances nutritives des tissus de chou qui servent de substrats aux bactéries lactiques. Le sel associé à l'acidité, inhibe le développement de la flore aérobie et atténue l'action des enzymes pectinolytiques des cellules végétales. Sa concentration optimale se situe entre 1,5 et 2,5 % du poids du chou. Lorsque la concentration est plus croquante.

- ❖ **Le pH** a une importance via la succession des flores qu'il induit, mais il doit être contrôlé puisque *Leuconostoc mesenteroides* y est extrêmement sensible. Son temps de division (temps nécessaire à une bactérie pour multiplier son nombre par deux) peut passer de 40 à 145 min lorsque le pH varie de 6,2 à 4,5. C'est pourquoi il est retrouvé dans la 1^{ère} phase de la fermentation.

2.2.3. Effets bénéfiques des Fruits et légumes fermentés

La fermentation transforme le produit en modifiant dans un sens favorable ses propriétés. La valeur alimentaire peut être améliorée par destruction de substances toxiques ou indigestes, par apparition de facteurs de croissance d'origine microbienne (vitamines, acides aminés) ou de manière plus générale par une modification favorable de la composition chimique. Les qualités organoleptiques peuvent être modifiées par transformation ou apparition de goûts et d'odeurs dans un sens favorable. Enfin l'aptitude à la conservation peut être meilleure grâce à la stabilisation du produit par élimination de substances aptes au développement de contaminants indésirables, Par « effet de masse » de la flore technologique sur l'implantation de contaminants, ou par production de substances à effet stabilisant ou antimicrobien (acides, alcools, produits générateurs de phénomènes d'antibiose, etc).

Les transformations en cause ne sont pas spécifiques : la même réaction peut selon le produit, les conditions d'application ou même le goût du consommateur, se révéler nuisible pour la qualité d'un produit ou utile dans le cadre d'une fermentation (Guiraud, 2003).

2.2.3.1. Améliorer la qualité et la sécurité alimentaire

La qualité nutritionnelle de la nourriture peut être améliorée par la fermentation, ce qui peut améliorer la digestibilité et les composants bénéfiques des aliments fermentés. Les matières premières ont augmenté le niveau de vitamines et la teneur en minéraux par rapport à son contenu initial. Nombreux composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les diacétyles et les bactériocines sont produits par le processus de fermentation, qui influe sur la croissance des bactéries non réciproque et d'autre part augmente la durée de conservation des aliments, la teneur en acide lactique du produit alimentaire fermenté peut améliorer l'utilisation du calcium, du phosphore et du fer et augmente également l'adsorption du fer et de la vitamine D. Les aliments fermentés ont une variété d'enzymes et chaque enzyme peut jouer un rôle différent dans l'amélioration de la

qualité des aliments. Dans la fermentation de produit alimentaire la Lactase dégrade le lactose en galactose. Le Galactose est un constituant important du cérébroside qui peut favoriser développement du cerveau chez les nourrissons. De même les protéinases produites par les bactéries lactiques peuvent décomposer la caséine en petits molécules digestibles. Les aliments fermentés sont riches en graisses globulaires qui peuvent être facilement digérées(Manas *et al.*, 2014).

2.2.3.2 Élimination des composés antinutritionnels

La plupart des fruits et des légumes contiennent des toxines et des composés antinutritionnels. Ceux-ci peuvent être enlevés ou détoxifiés par l'action des micro-organismes pendant le processus de fermentation. Les végétaux contiennent une série de composés, collectivement appelés antinutriments, qui interfèrent généralement avec l'assimilation de certains nutriments et dans certains cas peut même conférer à des effets physiologiques toxiques ou indésirables.

De tels antinutriments comprennent l'oxalate, la protéase et les inhibiteurs de l' α -amylase, les lectines, les tanins condensés et l'acide phytique. Nombreux traitements et méthodes de cuisson ont été montrés pour réduire éventuellement la quantité de ces antinutriments et donc leurs effets indésirables. Il a été conclu que la façon dont la nourriture est préparée et cuite est tout aussi important que l'identité de la nourriture elle-même. La recherche est actuellement axée sur l'identification des effets de plusieurs constituants antinutritionnels plutôt que d'étudier leur sort lors de la fermentation lactique(Manas *et al.*, 2014).

2.2.3.3. Améliorer des services pour la santé des humains

Nombreux chercheurs ont décrit les effets bénéfiques des bactéries lactiques. Cela peut modifier positivement le microbiote intestinal et empêcher la colonisation de d'autres pathogènes entériques. Les souches des LBA améliorent également les fonctions digestives, le système immunitaire, réduire le risque de cancer colorectal, contrôler les niveaux de cholestérol sérique, et d'éliminer les composés antinutritionnels non nécessaires présents dans les produits alimentaires. Les avantages globaux des bactéries lactiques pour la santé sont expliqués dans la figure (Settani et corsetti, 2008).

2.2.3.4. Biopréservation

Les consommateurs sont particulièrement conscients à des problèmes de santé liés aux additifs alimentaires ; les avantages pour la santé des aliments "naturels" et "traditionnels" sans conservateurs chimiques ajoutés, deviennent plus et plus attrayant.

Les additifs chimiques ont généralement été utilisés pour combattre les micro-organismes spécifiques. Dans le cas des aliments fermentés, les bactéries lactiques ont été essentielles pour ces millénaires. Elles jouent un rôle déterminant dans la préservation de l'innocuité microbienne des aliments fermentés, favorisant ainsi la stabilité microbienne des produits finaux de la fermentation. La protection des aliments est due à la production d'acides organiques, dioxyde de carbone, éthanol, peroxyde d'hydrogène et diacétyl les composés antifongiques tels que les acides gras ou l'acide phényllactique, les bactériocines et les antibiotiques tels que la reutéricycline(Settani et corsetti, 2008).



Chapitre II
Matériels et
Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé en deux parties, la première a été faite au niveau du laboratoire de recherche *eau, roches, plantes* ainsi qu'au niveau des laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre de l'université Djilali Bounaama, Khemis Miliana. Quant à la deuxième partie a été effectuée au sein de laboratoire d'analyses médicales du docteur ZIBOUCHE de Ain defla. En effet, les expériences ont été menées depuis le mois de mars jusqu'au mois de juin 2018.

1. Matériel**1.1. Source de chou**

Tous les légumes de chou ont été cultivés dans la région de Ain Defla et provenaient des récoltes de 2017 et 2018. Afin d'obtenir des données représentatives, les choux ont été achetés dans les grands marchés d'alimentation de la région de Ain defla.

1.2. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale dont les principaux sont les suivants :

Le milieu MRS à pH=6,8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifié à pH=5,4 (De Man et *al*, 1960).

Pour l'isolement des *Leuconostoc*, nous avons choisi deux milieux sélectifs pour éliminer et/ou ralentir la croissance des autres bactéries lactiques en utilisant communément la capacité à consommer le citrate, ou la capacité à résister à la vancomycine (milieu MRS + 30µg/ml vancomycine (Mathot et *al.*, 1994) ou la capacité à produire du dextrane à partir de saccharose, milieu MSE (Mayeux et *al.*, 1962).

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min.

1.3. Souches de référence

Pour les tests de l'activité antibactérienne, nous avons testé deux microorganismes pathogènes : *Escherichia coli* isolée cliniquement du laboratoire d'analyses médicales de docteur ZIBOUCHE, Ain Defla et la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2. Méthodes

2.1. Fabrication de choucroute

La figure ci-dessus présente les différentes étapes de fabrication dès la récolte jusqu'à le conditionnement. Nous avons suivi la méthode de prescott 1999.

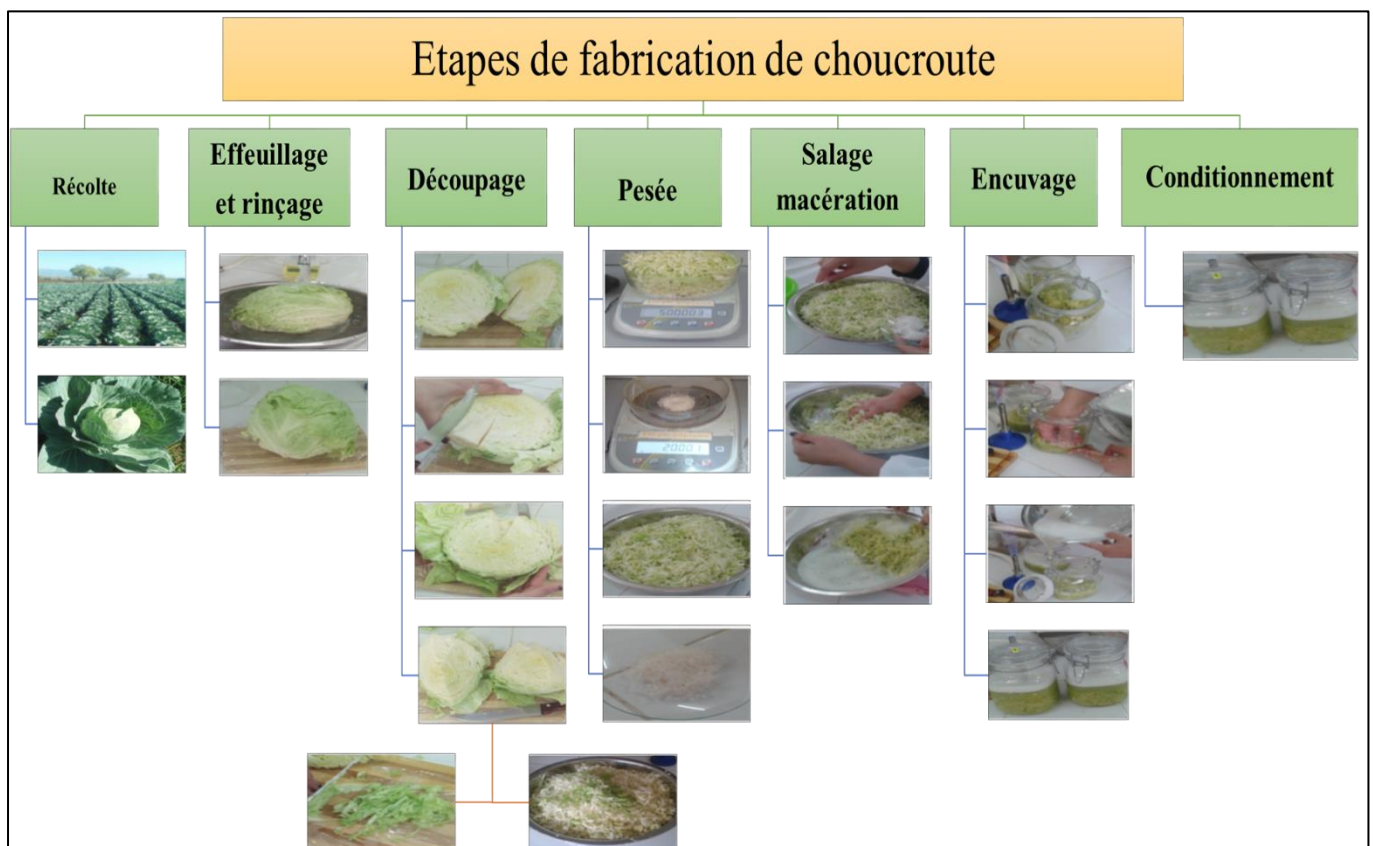


Figure 3 : étapes de fabrication de la choucroute.

2.2. Isolement et purification

2.2.1. Préparation de l'échantillon

➤ Dilutions décimales

1ml de l'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées de 10^{-1} à 10^{-7} , seules les dilutions, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} sont retenues et ensemencées en profondeur. L'incubation est faite à 30°C pendant 48h.

2.2.2. Purification des isolats

Après croissance et comptage des colonies en boite et par dilution, On prend de chaque boite 10 colonies isolées sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de la catalase.

Les bactéries à Gram⁺, catalase⁻, oxydase⁻ et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon/gélose MRS. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Heleni et *al.*, 2006) et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactiques en bouillon.

2.3. Conservation des isolats

* **A court terme** : la conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à +4°C, Le renouvellement des cultures se fait tous les trois semaines (Saidi et *al.*, 2002).

* **A long terme** : A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot.

Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorf à -20°C (figure 4). En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi *et al.*, 2002).

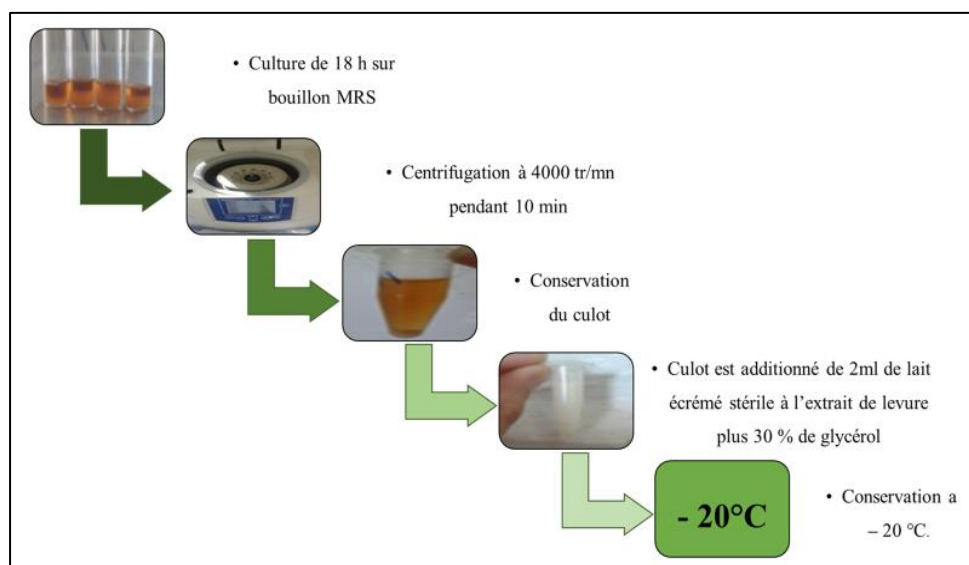


Figure 4 : Conservation de longue durée des souches pures (Saidi *et al.*, 2002).

2.4. Identification des souches

Suite à la purification des isolats, 54 souches ont été retenues, dont nous avons étudié les genres conformément au protocole de Carr *et al.*, (2002).

2.4.1. Critères morphologiques

2.4.1.1. Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique est porté sur l'observation macroscopique qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, taille, pigmentation contour, viscosité...).

2.4.1.2. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique au grossissement (G x100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996).

❖ La coloration de Gram

C'est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G^-) et les bactéries Gram positives (G^+). Celles-ci diffèrent de par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe (Larpent, 1990).

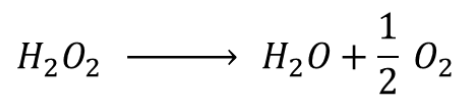
❖ **Technique :**

- La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur un milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile) puis on étale sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame ;
- La seconde étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame).
- La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes ;
- La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90°, (ne va traverser que la paroi de certaines bactéries « les Gram⁻ », et décolorer leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.
- En fin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

2.4.2. Critères physiologiques et biochimiques

2.4.2.1. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H₂O et $\frac{1}{2}$ O₂ (Guiraud 2003). La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

❖ **Technique :**

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boulée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

2.4.2.2. Croissance à différentes températures et thermorésistance

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 5 jours d'incubation à 4°C, 15°C, 37°C et 45°C (Guessas et Kihal, 2004).

Alors que la thermorésistance des bactéries a été testée au bain- marie à 63.5°C/30 minutes et 55°C/15 minutes puis ré- incubée à 30°C/24h à 48h (Guiraud, 2003).

2.4.2.3. Type fermentaire

Ce test permet de s'avoir le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose.

❖ Technique :

Un tube contenant le bouillon MRS (contient le glucose au lieu de lactose) et une cloche de Durham est inoculé avec la souche à étudier après incubation de 24h à 30°C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire (Haririet *al.*, 2009). Alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires.

2.4.2.4. Tolérance à la salinité et à l'acidité

Après avoir une culture jeune des isolats (cultures de 18h à 30°C), ces dernières sont ensemencées dans un milieu MRS liquide contenant 3% et 6.5 % de chlorure de sodium (NaCl) et le milieu MRS à différents pH : 9,6 ; 9 ; 4,8 ; 4, sont ensemencées et incubées à 30°C avec un témoin MRS liquide pendant 5 jours (Guessas et Kihal, 2004).

La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (Leveau et Bouix, 1980).

2.4.2.5. Croissance sur le lait bleu de Sherman

Pour tester le développement des souches en présence de 1% et 3% de bleu de méthylène. Du lait écrémé additionné de 0,1% et/ou 0,3% de bleu de méthylène (1ml de solution à 1% et/ou 3% par tube de 9ml de lait) est ensemencé et incubé durant une période de 24 à 48h à 30°C.

Lactococcus lactis est capable de pousser en présence de 0,3% de bleu de méthylène (Leveau et *al.*, 1991).

2.4.2.6. Hydrolyse d'arginine

L'arginine dihydrolase (ADH) est une enzyme capable de dégrader l'arginine en ammoniac, et des amines (composés basiques) mis en évidence en bactériologie dans les M16 BCP. Pour l'identification bactérienne ce milieu fait partie des milieux d'étude du métabolisme protidique. Il permet de révéler les décarboxylases liées à l'acide aminé étudié (Arginine) (Thomas, 1973).

Pour chaque souche, nous avons ensemencé un tube de bouillon Moeller avec arginine et un tube témoin (bouillon Moeller sans arginine). Les deux tubes sont recouverts avec 4 à 5 mm de paraffine stérile. L'incubation se fait à 30°C pendant au moins 4 jours. La culture dans le milieu de base se manifeste par un virage au jaune du au métabolisme du glucose.

Les souches qui possèdent l'ADH (Arginine dihydrolase) vont acidifier le milieu en fermentent le glucose (virage au jaune). Cette acidification favorise l'activité de l'arginine dihydrolase qui va dégrader l'arginine et libérer l'ammoniac ce qui entraîne une alcalisation du milieu qui se manifeste par un virage de l'indicateur de pH au violet

Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et réalcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres. La couleur de l'indicateur de pH demeure inchangée. Nous avons également réalisé des ensemencements des cultures jeunes de 18h sur milieu solide M16 BCP et incubé à 30°C pendant 24h à 48h.

2.4.2.7. Test mannitol-mobilité

Selon Guiraud, (2003), la mobilité des bactéries repose sur l'ensemencement de la souche par piqure centrale d'un milieu semi-solide. L'incubation est réalisée durant 24h à 30°C. La gélose semi solide mannitol mobilité permet de vérifier la mobilité des souches.

❖ Lecture :

- Souche mobile : envahissement du milieu.
- Souche immobile : pas d'envahissement de milieu.

2.4.2.8. Production de dextrane

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux et *al.*, 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

2.4.2.9. Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (Guiraud, 2003) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30°C. Après 24h et dans un tube à hémolyse on dépose 2ml de cette culture avec 0.5ml de réactif α naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP1) et 0.5ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP2) pour assurer la réaction de Voges-Proskauer dite réaction de VP, on agite soigneusement les tubes et on les laisse en contact avec l'air libre pendant 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

2.4.2.10. Utilisation de citrate

L'utilisation de citrate est étudiée sur milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980) qui contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide.

Après 18h-72h d'incubation les colonies qui ferment le citrate (grâce à la citratase qui est une enzyme existe dans certaines espèces de *Leuconostoc*) lancent la réaction entre ces ions ils apparaissent sous forme de colonies bleues ou ayant un centre bleu. Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches.

2.4.2.11. Hémolyse

L'hémolyse a été testé sur milieu gélose au sang base additionné à 5ml de sang frais par flacon. Après avoir laissé refroidir le milieu, le prélèvement est fait sur place et les 5ml sont ajouté au milieu et mélanger soigneusement puis couler sur boîte. L'ensemencement fait par stries. Après incubation à 30°C., le type d'hémolyse a été examiné. Il peut être α hémolytiques « hémolyse partielle » (couleur verte autour des colonies); β hémolytiques « hémolyse totale » (éclaircissement autour des colonies) ou δ hémolytiques « non hémolytique » (le milieu n'est pas modifié) (Idoui et *al.*, 2009).

2.4.2.12. Fermentation des hydrates de carbonés

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. Ce test est réalisé en galeries classiques de tubes sur bouillon MRS sans extrait de viande et sans glucose additionné d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0.05 g/l) (Leveau *et al.*, 1991). Le glucose du milieu MRS est remplacé par l'hydrate de carbone à tester, les solutions de sucres (mannitol, xylose, maltose, fructose, glucose, lactose, saccharose, adonitol, cellobiose).

Les solutions sucrées sont préparées dans 100 ml d'eau distillé à raison de 20% des différents sucres. La croissance est appréciée par le virage de l'indicateur de pH.

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'addition d'une couche d'huile de paraffine stérile à la surface de milieu de culture (Samelis *et al.*, 1994). L'acidification est appréciée après 18 à 72h d'incubation à 30°C par virage au jaune du milieu.

2.5. Etude de l'activité antibactérienne des souches

2.5.1 Méthode de double couche

La méthode de Fleming *et al.*, (1975) a été suivie. Pour mettre en évidence les zones d'inhibition, les souches lactiques ont été ensemencées en touche (à l'aide d'un inoculateur multipoint stérile) à la surface d'un milieu MRS ou M17 solide à partir d'une culture de 24h, les boîtes sont séchées sous la température ambiante pendant 2h. Après 24 h d'incubation chaque spot est recouvert avec une goutte de gélose nutritive maintenue en surfusion (50°C).

Cela permet de fixer les colonies et d'éviter leur dispersions (Larpen-Gourgaud *et al.*, 1997). Une couche de gélose molle (0,7%) contenant 0,1 ml d'une culture en milieu liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène), est coulée au-dessus de la première couche de gélose.

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 30°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

2.5.2 Méthode des puits

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grandes zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances

peuvent diffuser dans un milieu de culture solide. Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS ou M17 liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min (Barefoot et Kaenhammer, 1983).

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose nutritive inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji et *al.*, 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem et *al.*, 2011).

2.6. Détermination de la valeur nutritive du chou avant et après fermentation

2.6.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué de deux façons différentes selon la nature des aliments.

* **Aliments crus « chou frais »** : Trois échantillons ont été prélevés pour chaque analyse. Les échantillons provenant ont été réunis pour constituer un pool représentatif.

Les échantillons ont été expédiés dans les 24h au laboratoire dans une glacière pour garder les choux à leurs état frais le plus maximum possible.

* **Aliments transformés « chou fermenté : choucroute »** : Trois échantillons provenant de deux fermentations différentes effectuées principalement au laboratoire de microbiologie de l'université de Khemis Miliana. Les fermentations ont été effectuées à 18°C dans des périodes de 21 jours et 39 jours respectivement.

2.6.2. Préparation des échantillons

Les parties comestibles ont été coupées ou râpées au robot culinaire avant d'être homogénéisées jusqu'à consistance uniforme avec un robot culinaire. Dans certains cas, une quantité connue d'eau déminéralisée a été ajoutée pour faciliter l'homogénéisation des choux. Les homogénats ont été conservés dans des contenants hermétiquement fermés au réfrigérateur à 4°C (Zee et *al.*, 1987).

2.6.3. Analyses chimiques

Tous les échantillons ont été analysés en duplicata. Lorsque l'écart entre deux résultats apparaissait important, une troisième analyse a été faite.

2.6.3.1. Potentiel d'hydrogène

Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un pH mètre analytique.

2.6.3.2. Dosage de l'acidité totale titrable

Beaucoup d'aliments contiennent différents acides organiques plus ou moins volatils. L'aliment est d'abord dilué si la concentration d'acides organiques est importante. Une portion de la solution diluée est ensuite titrée par une solution standardisée de NaOH 0,1N, en présence d'un indicateur. Pour les aliments trop colorés, on utilise un pH mètre pour la détection du point de virage (pH 8,3 pour la phénolphthaléine). Selon l'aliment analysé, le résultat peut être exprimé (Salghi,2008) :

- En % P/P ou P/V d'un acide organique particulier
- En ml de NaOH 0,1N par 100 g ou 100 ml d'aliment.

Le dosage a été effectué selon le protocole décrit par (salghi,2008).

2.6.4. Analyses biochimiques

2.6.4.1. Dosage de l'eau et des solides totaux

Les solides totaux sont définis comme étant le résidu d'un aliment restant après élimination de l'eau, dans des conditions expérimentales données. On rapporte la teneur en eau ou en solides totaux selon le type d'aliment ou les normes de composition s'appliquant à l'aliment sous analyse.

$$\% \text{H}_2\text{O} + \% \text{S. T.} = 100\%$$

La teneur en eau et en solides totaux a été déterminée en utilisant la méthode thermogravimétrique (méthode d'étuvage). L'analyse nécessite l'emploi d'une étuve ventilée, ainsi que d'un dessiccateur contenant un agent desséchant.

Le dosage a été effectué selon la norme décrite par : (AOAC, 1984 : méthode 24,003).

2.6.4.2. Dosage des cendres totales

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Les cendres représentent environ 1 à 5% de la masse d'un aliment sur une base humide.

Le dosage a été effectué selon la norme décrite par : (AOAC, 1984 ; méthode 31.012).

2.6.4.3. Dosage des glucides

Il existe beaucoup de méthodes de dosage des glucides. Certaines de ces méthodes utilisent le pouvoir réducteur ou non réducteur des sucres. Un sucre réducteur doit posséder dans sa structure une fonction aldéhyde ou cétone libre.

La méthode *Munson-Walker* est une méthode gravimétrique de détermination des sucres réducteurs totaux dans les aliments. C'est une méthode empirique qui relie, à l'aide d'une table de conversion, une quantité de précipité formé par la réaction de Fehling à une quantité d'un sucre réducteur particulier. Les sucres possédant une fonction aldéhyde ou cétone libre peuvent réduire l'hydroxyde cuivrique (réactif de Fehling) en oxyde cuivreux, un précipité de couleur rouge brique (Salghi, 2008).

2.6.4.4. Dosage des protéines

L'estimation des quantités de protéines a été réalisée selon la méthode de dosage de Bradford (1976).

2.6.4.5. Détermination des lipides

Selon Zee et *al.*, (1976) La quantité de lipides a été obtenue par différence en utilisant l'équation ci-dessus :

$$\% \text{ lipides} = 100 - (\% \text{ eau} + \% \text{ protéines} + \% \text{ glucides totaux} + \% \text{ cendres})$$

2.6.4.6. Détermination des fibres alimentaires

L'estimation des fibre alimentaires a été réalisée selon le protocole décrit par (Mazumdar et Majumder, 2003)

2.6.4.7. Dosage de l'acide ascorbique

Le dosage de la teneur en acide ascorbique a été réalisé selon le protocole décrit par (Bergeret, 1986).

2.6.4.8. Détermination de la valeur énergétique

Toute partie digestible d'un aliment fournit, après son assimilation dans l'organisme, un nombre de calories en rapport avec la quantité ingérée. Les constituants principaux des aliments (protéines, graisses, hydrates de carbone) peuvent généralement se substituer les uns aux autres (loi de l'isodynamie) il s'ensuit que le nombre total de calories d'une denrée s'obtient directement par addition des valeurs caloriques des différents nutriments.

Le pouvoir calorifique des différents nutriments a été mesuré expérimentalement dans les meilleures conditions. A partir de ces valeurs expérimentales, des valeurs moyennes ont été fixées pour chaque nutriment (EPSIC, 1999).

La valeur énergétique des aliments a été calculée à l'aide de l'équation décrite par (Haytowitz et Matthews, 1984) en utilisant les facteurs de calorie appropriés.

2.6.5. Analyse statistique de résultats :

L'exactitude d'une analyse est définie comme étant le degré de concordance entre la valeur mesurée et la valeur réelle. L'exactitude d'une méthode analytique est reliée aux erreurs systématiques, c'est-à-dire aux erreurs qui affectent les résultats toujours dans le même sens. Une erreur systématique peut apparaître à un moment donné dans une méthode ou même être permanente dans une méthode. Les erreurs systématiques, une fois décelées, peuvent toujours être éliminées.

La valeur de répétabilité d'une méthode analytique est habituellement déterminée en faisant l'analyse statistique d'un certain nombre de mesures de la même grandeur sur un échantillon. Les statistiques nous indiquent que la valeur estimée de l'écart-type peut être obtenue, à partir d'une population de N résultats. (Salghi, 2008).

Les résultats de l'expérimentation obtenus ont été analysés en par logiciel de calculs EXCEL 2016 et exprimée avec un double écart-type moyenne par rapport à la moyenne dont la valeur de cette écart-type est arrondie à 1 chiffre significatif.



Chapitre III
Résultats et
Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

Première partie

1. Isolement

Lors de cette étude 54 souches ont été isolées, à partir de choucroute fabriquée localement. Ces isolats répondent aux caractéristiques communes des bactéries lactiques (Gram⁺, Catalase⁻, Oxydase⁻, Nitrate réductase⁻). Leur identification a été réalisée par des procédures phénotypiques conventionnelles, basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

2. Identification

2.1. Examen macroscopique

Les caractères macroscopiques permettent de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu MRS solide après 48h d'incubation à 30°C (Ana Belen florez et *al.*, 2006), et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité). Pour les isolats testés, nous avons observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 1mm de diamètre de différentes formes, de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse et pourtour circulaire régulier (figures 6, 8).

Sur bouillon MRS, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques (figure 7).

2.2. Examen microscopique

L'aspect microscopique des souches après coloration de GRAM a révélée deux formes de cellules : coques ou bâtonnets. Les cellules étaient souvent disposées en courtes ou longues chainettes, cependant des structures isolées et en paires étaient également observées (figure 9).

2.3. Caractères physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests effectués pour l'identification biochimique et physiologique des bactéries pré-identifiées sont illustres par les figures (10, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17) et rassemblés respectivement dans le tableau 3 et 4.

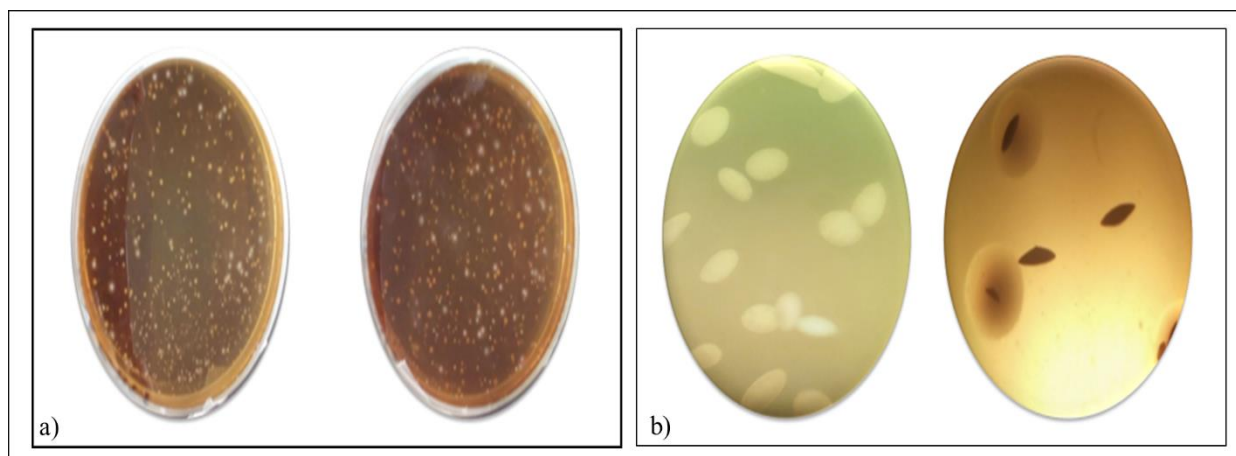


Figure 6 : Aspect macroscopique a l'œil nu (a), sous la loupe (b) des colonies des bactéries lactiques isolées après ensemencement en masse sur milieu MRS solide pendant 48h à 30°C.

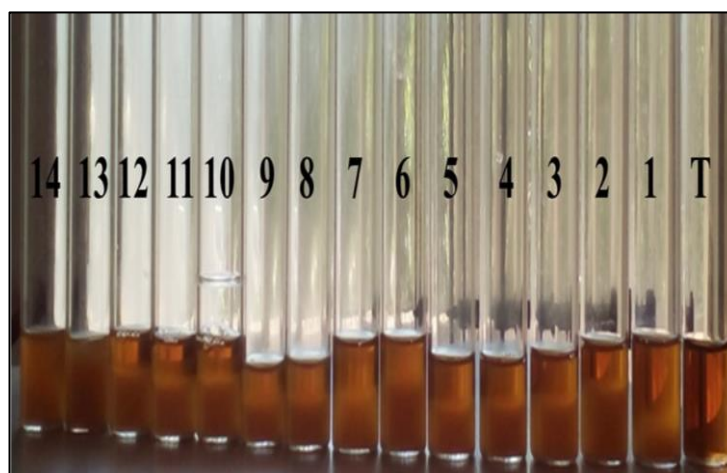


Figure 7 : Aspect des colonies des bactéries lactique sur milieu MRS liquide après 48h d'incubation à 30 °C.

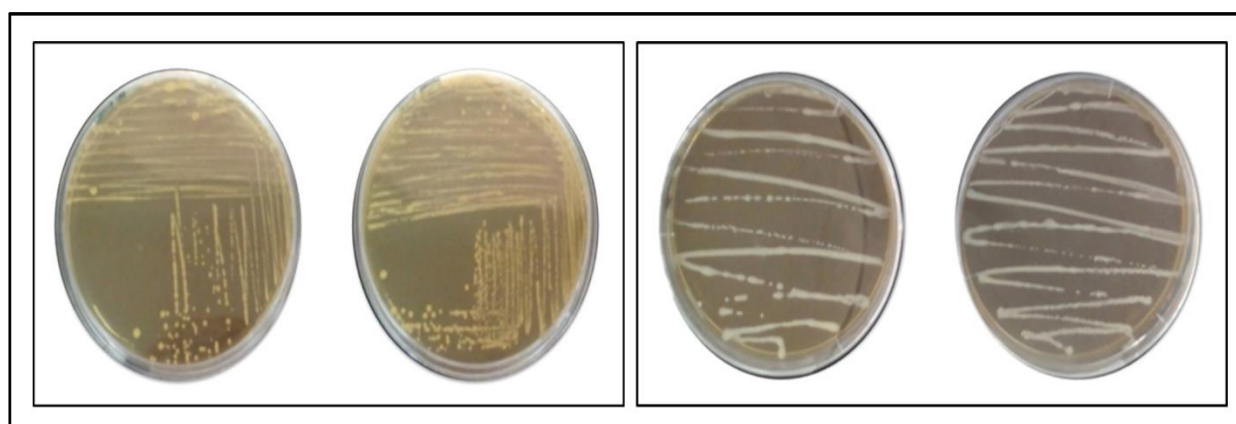


Figure 8 : Aspect des cultures pures des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après 48h d'incubation à 30°C.

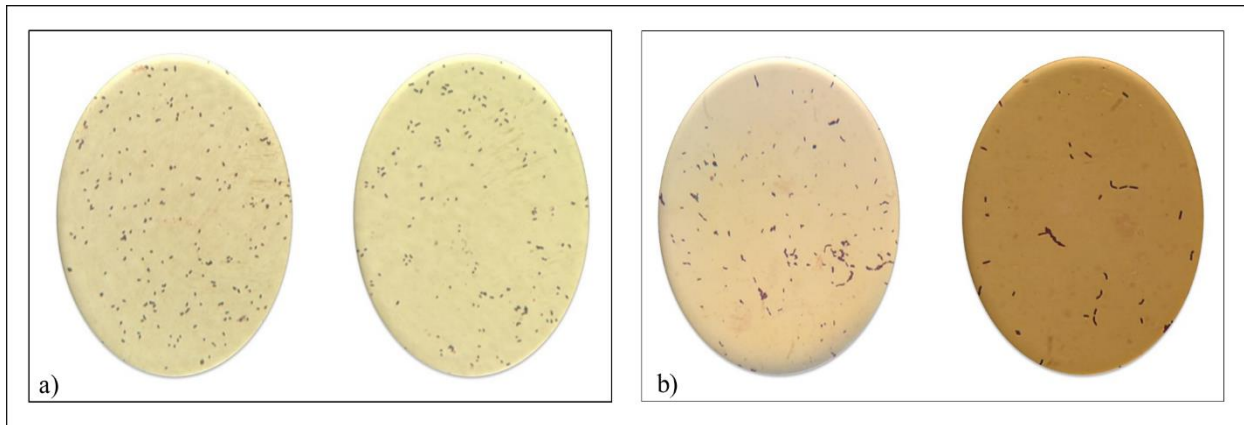


Figure 9 : Observation microscopique des coques(a) et des bacilles(b) après coloration de GRAM (Gx100).

2.3.1. Croissance à 15 et 45°C et la thermorésistante

Cette étude Permet de faire la différence entre la flore thermique et mésophile et de sélectionner les souches thermorésistantes (Badis et *al.*, 2004).

2.3.2. Type de fermentaire

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et hétérofermentaire en utilisant un milieu glucosé stérile qui contient une cloche de Durham. Aucune production du gaz (CO₂) à partir de glucose n'a été observée chez les isolats (A1,A2,A3,A4,A5,A6,B1, B2,B3,B7, B9, BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH, BI, BJ, BK, BL, BM, C1,C2,C3,C4,E,1,2,4,7,9,10,11,13).

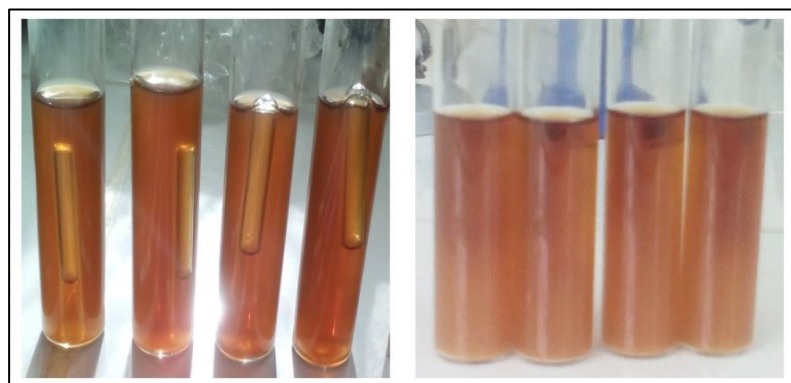


Figure 10 : Résultat de type de fermentaire sur MRS liquide après incubation 48 h à 30°C.

2.3.3. Tolérance à la salinité et à l'acidité

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches isolées peuvent se développer en milieu contenant des concentrations de 3% et 6,5% de NaCl (tableau 3 et 4).

Toutes les souches isolées sont capables de se développer à pH : 4 ; 4,8 ; 9 ; 9,6 ; sauf les souches A, C, D, E qui ne peuvent pas survivre à pH : 4.

2.3.4. Croissance sur lait de Sherman

La coagulation de lait et la réduction de bleu de méthylène (1%) ont été remarquées chez la plupart des souches. Par ailleurs celle de (3%) elle n'a pas été enregistré chez toutes les souches (figure 11).

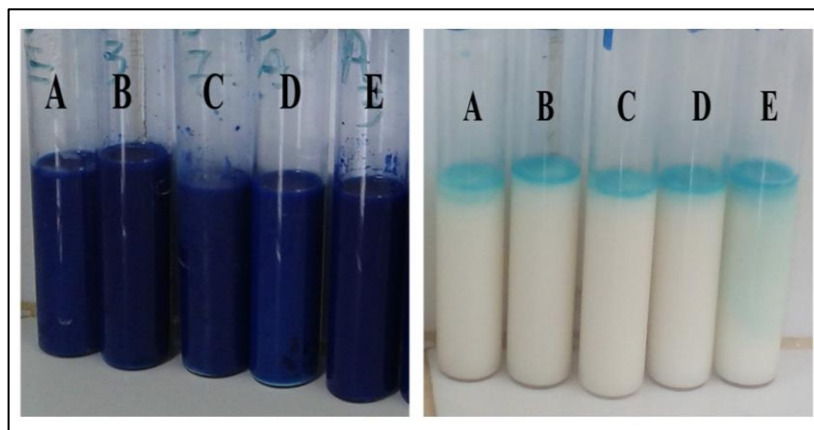


Figure 11 : Croissance en milieu lait de Sherman à 1% et 3%.

2.3.5. Test d'ADH

Ce test est réalisé sur milieu Moeller et M16 BCP, les résultats positifs se traduisent par une couleur violette qui signifie la présence de deux enzymes l'arginine dihydrolase et décarboxylase. La plupart des isolats sont ADH négative sauf (B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, 7,10, 14, C2, A2, A3, A4, A5) (figure 12).

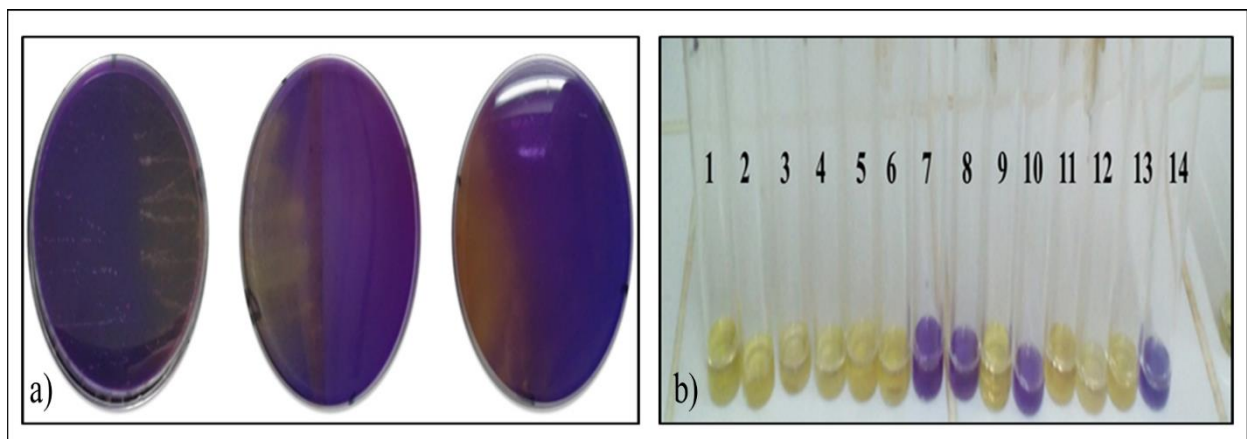


Figure 12 : Résultats de l'hydrolyse d'arginine sur milieu M16 BCP (a) et sur milieu Moeller (b).

2.3.6. Test mannitol de mobilité

Toutes les bactéries isolées sauf la souche D ont été développées sur tout au long de la pique sans envahissement du milieu, généralement elles sont immobiles (figure 13).

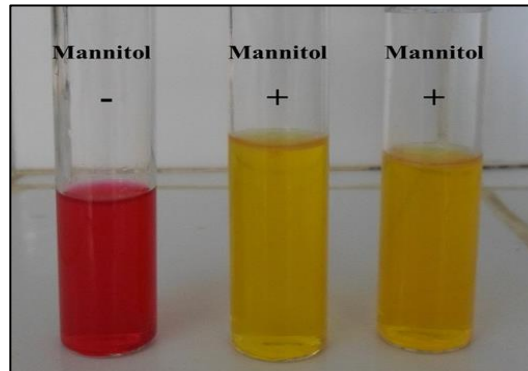


Figure 13 : Résultats de la mobilité sur milieu mannitol après incubation 24h à 30°C.

2.3.7. Production de dextrane

La production de dextrane à partir du saccharose a été observée chez la plupart des souches de *Leuconostoc* (Figure 14). Ce caractère permet la distinction entre les sous espèces *Ln.mesenteroides* subsp *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp *dextranicum* et les autres espèces.

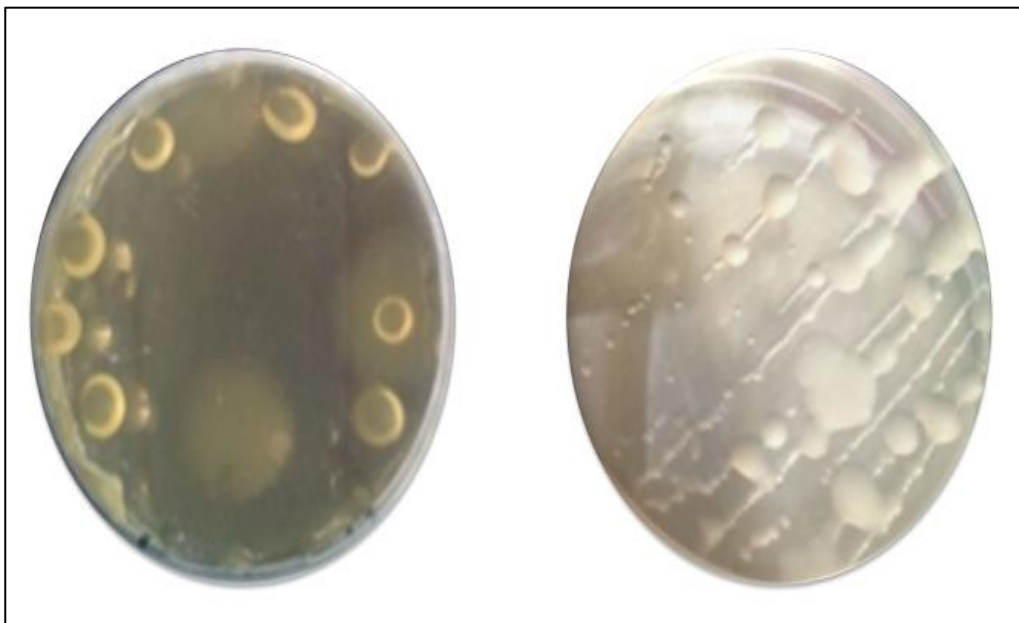


Figure 14 : Aspect des colonies des bactéries lactiques sur milieu MSE après incubation 24h à 30°C.

2.3.8. Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (Fil, 1996). Tous nos isolats de leuconostoc ne produisent pas l'acétoïne, la plupart des *Lactobacillus* le produisent, les *Lactococcus* sont variables

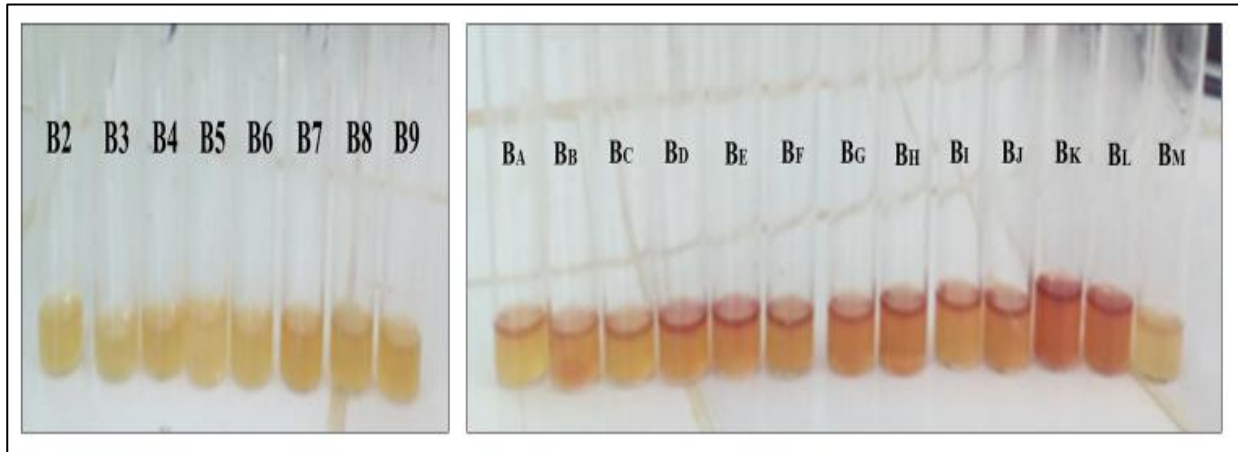


Figure 15 : Révélation de la production d'acétoïne sur milieu Clark et Lubs après incubation 24h à 30° C.

2.3.9. Utilisation de citrate

Le caractère d'utilisation de citrate est présent chez la plupart de nos souches Sauf la souche A4. Ce caractère a été observé sur milieu Kempler et Mc Kay., (1981) (figure16)

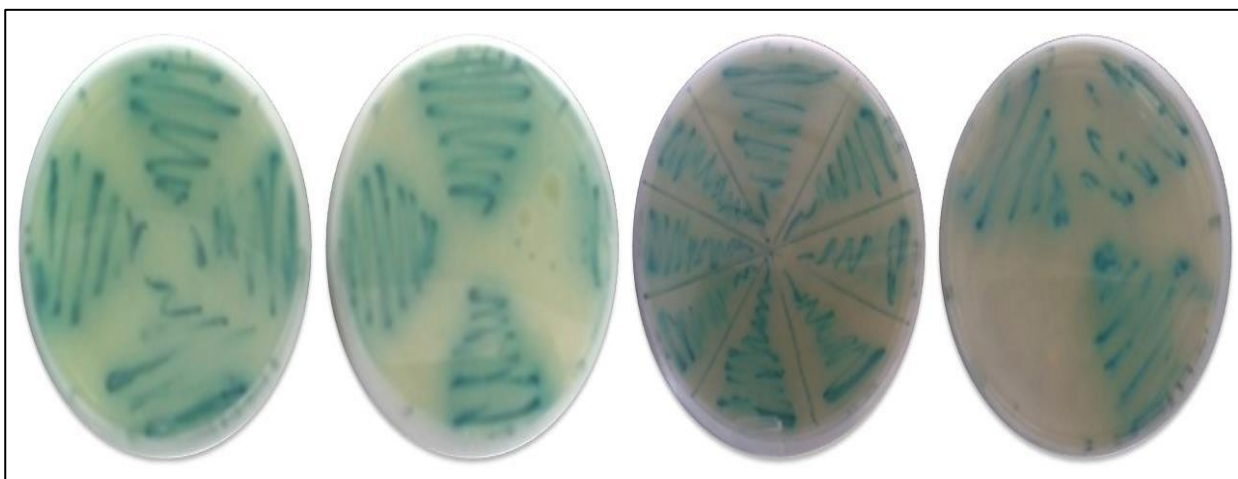


Figure 16 : révélation de l'utilisation de citrate par l'apparition de colonies bleues sur le milieu KMK.

2.3.10. Fermentation des hydrates de carbones

L'identification est complétée par l'étude de la fermentation des hydrates de carbones (figure17).

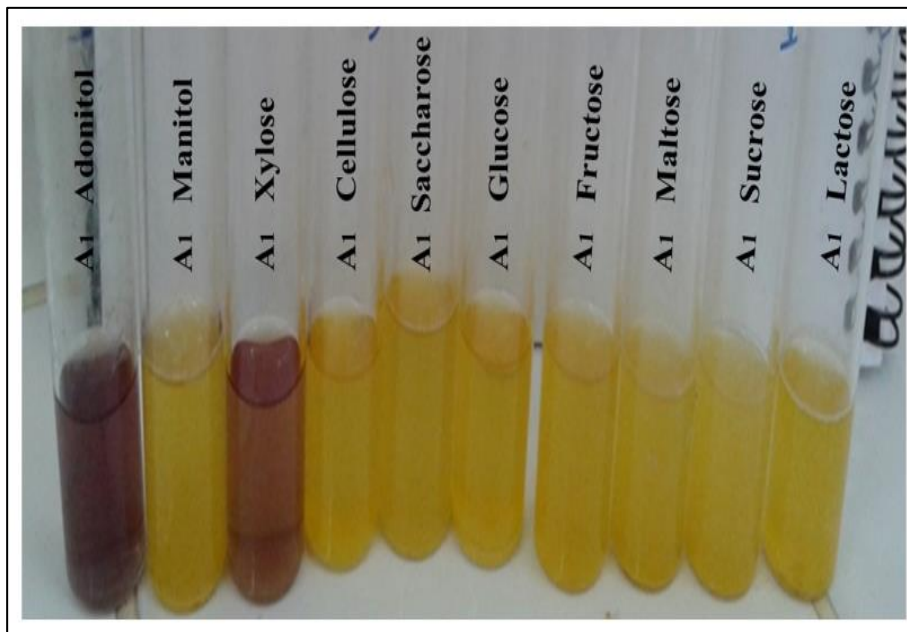


Figure 17 : Résultats de fermentation des hydrates de carbure après incubation 24h à 30°C.

Les résultats de La fermentation des sucres par les souches isolées sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : profil fermentaire des isolats.

	GLU	XY	SU	SC	Mn	ML	Fr	CL	LC	AD
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
H	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
13	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BF	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BG	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BH	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BI	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BJ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BM	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

GLU : Glucose - XY : Xylose - SU : Sucrose - SC : Saccharose - Mn : Mannitol- ML: Maltose - Fr : Fructose CL: Cellebiose - LC : Lactose - AD : Adonitol.

2.4. Antibio résistance

L'Antibiogramme a été effectué pour les 54 souches isolées sur milieu solide Muller Hinton vis à vis 7 antibiotiques. Après une culture de 24h, la sensibilité des souches est détectée par formation des zones d'inhibition (figure 18). les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau 6.

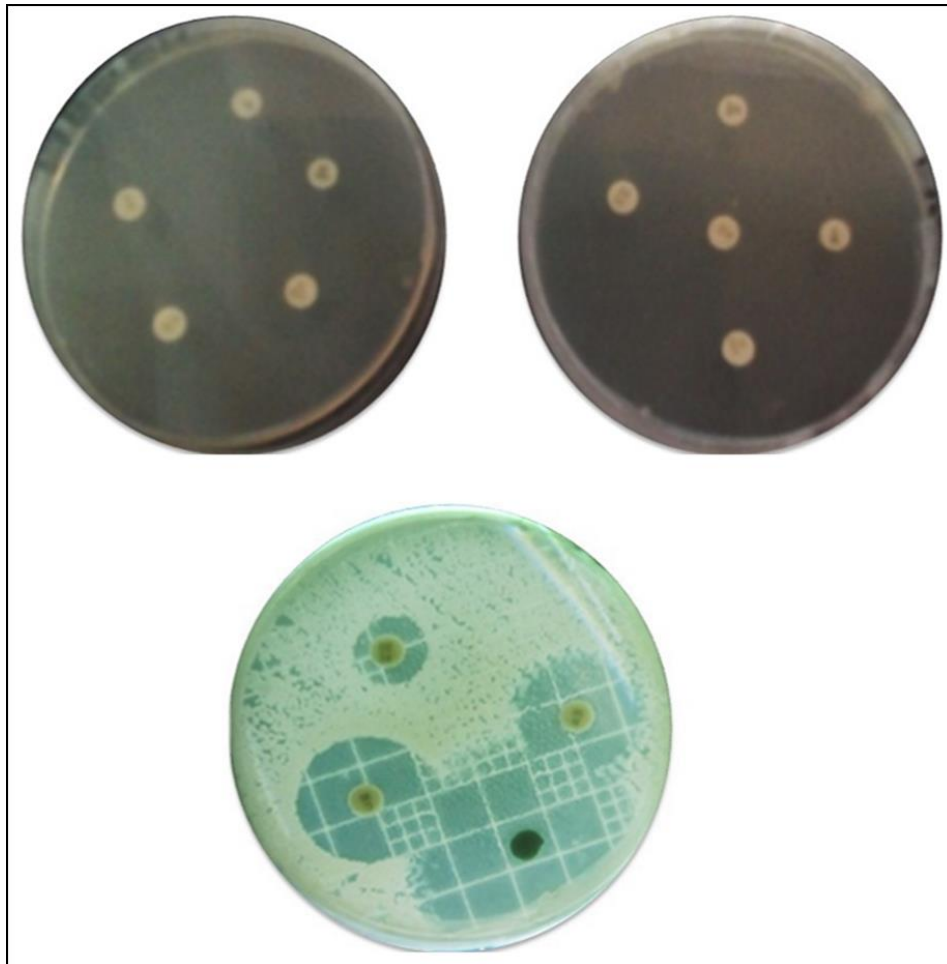


Figure 18 : Résultats de tests d'antibiogramme après incubation 24h à 30°C.

Tableau 6 : Résultats de test de résistance aux antibiotiques.

	C30	PI20	GENT	N30	AX	VENC	SXT
B1	R	R	R	R	R	S	R
B2	R	R	R	R	R	S	R
B3	R	R	R	R	R	S	R
B4	R	R	R	R	R	R	R
B5	R	R	R	R	R	R	R
B6	R	R	R	R	R	R	R
B7	R	R	R	R	R	S	R
B8	R	R	R	R	R	R	R
B9	R	R	R	R	R	S	R
A1	S	S	S	S	R	R	R
A2	S	S	S	S	R	R	R
A3	S	S	S	S	R	S	R
A4	S	R	S	S	R	R	R
A5	S	S	S	S	R	R	R
A6	S	S	S	S	R	R	R
A	R	R	S	R	R	R	R
B	S	R	S	R	R	R	R
C	R	R	R	R	R	R	R
D	S	R	S	R	R	R	R
E	R	R	S	R	R	R	R
F	R	R	R	R	R	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R
H	R	R	R	R	R	R	R
1	R	R	R	R	R	R	R
2	R	R	R	R	R	R	R
3	S	R	S	S	R	S	R
4	S	S	S	S	R	S	R
5	S	R	S	S	R	S	R
6	S	R	S	S	R	S	R
7	S	R	R	R	R	S	R
8	R	R	R	R	R	R	R
9	R	R	R	R	R	R	R
10	R	R	S	S	R	S	R
11	R	R	S	S	R	S	R
12	R	R	S	S	R	S	R
13	R	R	R	R	R	R	R
14	R	R	R	R	R	S	R
BA	R	R	R	R	R	R	R
BB	R	R	R	R	R	R	R
BC	R	R	R	R	R	R	R
BD	R	R	R	R	R	R	R
BE	R	R	R	R	R	R	R
BF	R	R	R	R	R	R	R
BG	R	R	R	R	R	R	R
BH	R	R	R	R	R	R	R
BI	R	R	R	R	R	R	R
BJ	R	R	R	R	R	R	R
BK	R	R	R	R	R	R	R
BL	R	R	R	R	R	R	R
BM	R	R	R	R	R	R	R
C1	R	R	R	R	R	R	R
C2	R	R	R	R	R	R	R
C3	R	R	R	R	R	R	R
C4	R	R	R	R	R	R	R

R : résistante – S : sensible

2.5. Activité antibactérienne

Les souches isolées de la choucroute ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négatif et les Gram positif ou nous avons pris comme exemple type *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 respectivement.

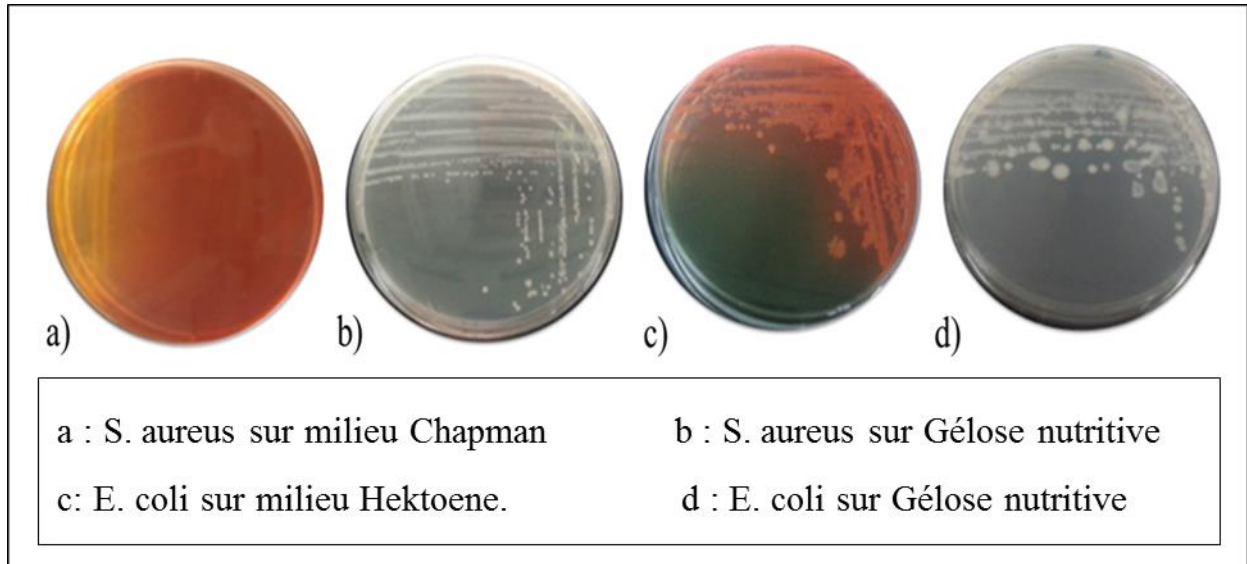


Figure 19 : Aspect macroscopique des bactéries pathogènes après 24h d'incubation.

Notre choix s'est donc porté sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de (Barfoot et Kaenhammer, 1983) qui nous a permis de faire une première sélection des souches lactiques antibactériennes.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire au tour des puits ensemencés par les souches lactiques de notre collection (figure 20).

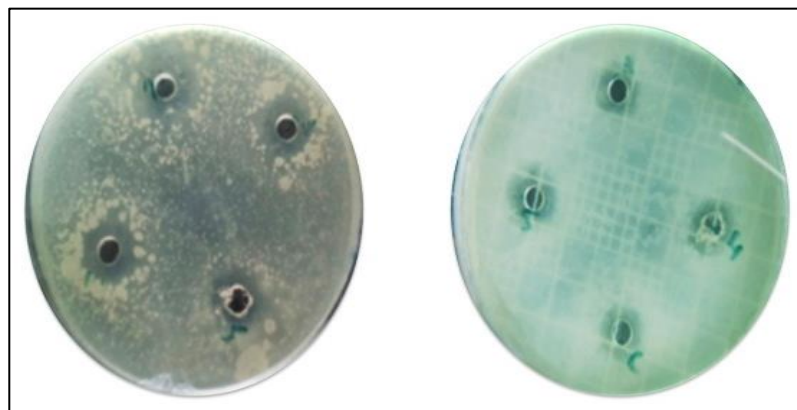


Figure 20 : Inhibitions obtenues par les souches isolées.

Le tableau 7 représente les résultats des différentes interactions.

Il est bien clair que toutes les souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes (*E. coli* et *Staphylococcus aureus*). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Lucke, 1989).

Tableau 7 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barfoot et Kaenhammer., (1983).

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		Souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A	13	13	BF	12	10
B	13	13	BG	15	14
C	13	15	BH	17	14
D	12	14	BI	15	12
E	10	15	BJ	14	10
F	12	10	BK	14	17
G	10	13	BL	13	17
H	10	13	BM	15	15
1	13	10	C1	14	14
2	15	11	C2	15	10
3	14	10	C3	13	15
4	13	15	C4	13	12
5	15	17	B1	9	10
6	13	15	B2	7	10
7	13	12	B3	10	10
8	13	17	B4	12	10
9	12	17	B5	13	12
10	13	15	B6	15	15
11	6	15	B7	9	12
12	10	10	B8	10	12
13	4	12	B9	8	15
14	0	10	A1	15	13
BA	9	13	A2	14	12
BB	9	12	A3	15	13
BC	15	14	A4	15	13
BD	12	12	A5	15	14
BE	12	10	A6	15	14

L'identification des souches a été réalisée en suivant les recommandations de Novel., (1993) ; Larpent et al.,(1997) ; Carr et al.,(2002); Guiraud., (2003) ; Axelsson., (2004) ; Badis et al.,(2004) ; Hammes et Hertel., (2006) ; Björkrdh et Holzapfel, (2006).

L'identification microbiologique et la caractérisation technologique de la microflore lactique de la choucroute préparée localement ont été abordées. Les résultats des tests microbiologiques classiques ont permis une pré-identification de plusieurs espèces dont : 11 souches réparties essentiellement sur *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*; une souche représentée par *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* ; quatre souches sont réparties sur *Leuconostoc paramesenteroides* ; deux souches représentent *Leuconostoc sp*; aussi 16 souches sont réparties sur *Lactobacillus plantarum* ; une souche de *Lactobacillus acidophilus* et une souche de *Lactobacillus casei / rhamnosus* et 17 souches de *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*.

Les souches de *Leuconostoc* développées sur milieu MSE forment des colonies brillantes transparentes, gluantes (1 à 5 mm) ne devenant muqueuses qu'après séjour à la température du laboratoire à cause de la production de dextrane (Larpent et al., 1997). Sur milieu MRS solide se sont révélées des petites colonies ponctiformes de couleur blanchâtre à pourtour régulier de 1mm de diamètre. L'observation après coloration de Gram, indique qu'il s'agit des coques ovoïdes Gram positif regroupés en paires ou en chaînettes (Novel, 1993).

Selon Garvie (1986) les corps cellulaires des leuconostoc peuvent être sphériques, mais souvent lenticulaires, surtout lorsqu'ils sont cultivés sur milieu gélosé. Les leuconostoc fermentent le glucose avec production de gaz (CO₂), donc sont hétérofermentaires. Ces souches produisent aussi du CO₂ à partir du citrate, ne produisent pas l'acétoïne, n'hydrolysent pas l'arginine, se développent à 37°C, et en présence de 6,5% de NaCl.

A partir de ces tests on conclut que toutes les souches de ce genre appartiennent à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. Celles identifiées comme étant *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* ont la capacité de dégradation de l'arabinose, arbutine, Cellobiose, mannitol et salicine

Leuconostoc mesenteroides subsp *dextranicum* se distingue aisément de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, elle ne fermente ni l'arabinose, ni cellobiose, ni le mannitol et la salicine et avec *mesenteroides* subsp *cremoris* par son incapacité à produire de dextrane (Holzapfel, 2009 ; Milliere et al., 1989).

Les souches A, B, C, F, G, H, 8, B4, B5, B6 sont des *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* ; la souche D est *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* ; les souches 3, 5, 6, 12 sont des *Leuconostoc paramesenteroides* et les souches B8 et 14 sont considérées comme *Leuconostoc sp.*

Parmi le genre *Lactococcus*, nous avons trouvé 17 souches identifiées comme étant *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*. L'aspect macroscopique a montré que les lactocoques développent sur milieu MRS de petites colonies à contour régulier de couleur blanchâtre, lisses et légèrement bombées.

Microscopiquement sont des Gram positifs, de forme cocci sphérique, associés en paire, groupées en chaînettes plus au moins longues (Teuber et Geis, 2006). Par ailleurs, nous distinguons des souches typiques et d'autre atypiques car certaines de leurs caractères ne correspondent pas aux données rapportées par Teuber et Geis, (2006); Stiles et Holzapfel, (1997). Selon ces auteurs, les lactocoques sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C et ne poussent pas à 6,5% de NaCl. Cependant au cours de cette étude, nous avons isolé des souches atypiques qui poussent à 45°C et en présence de 6,5% de NaCl, même résultats a été obtenu par Franciosi et *al.*,(2009) . Des résultats similaires ont été rapportées par Kacem et *al.*,(2002) ; Karam et *al.*,(2008).

Ces souches atypiques résistent aussi à 63°C pendant 30 min. Les lactocoques atypiques présentent un double intérêt, vu leur croissance en milieu à haute salinité et leur taux de survie dans des conditions hostiles à haute température (Bensalah, 2006). Les souches 1, 4, 7, 9, 10, 13, B1, B2, B3, B7, BA, BB, BC, BM, présentent un développement positif à 4% et 6,5% de NaCl et sont acétoïne négatif (Kacem et *al.*, 2002). Toutes les souches de ce genre sont apparentées à *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*.

Les *Lactobacillus* se multiplient mal sur les milieux ordinaires et nécessitent souvent des conditions semi-anaérobies. Le milieu de culture et d'isolement de base le plus connu est le milieu MRS.

Les *Lactobacillus* étaient micro aérophile, il est préférable d'effectuer l'isolement et la numération par la technique de double couche de gélose en boîte de pétri ou bien de façon plus pratique par l'étalement à la surface de la gélose, et l'incubation à lieu à 30°C cependant 2 à 3 jours. Les Lactobacilles présentant des optima de température de croissance très

variables, la température 30°C favorise l'isolement et la numération. Il peut être intéressant d'isoler et dénombrer des Lactobacilles thermophiles par incubation à 45°C (Guiraud, 2003)

D'après l'observation macroscopique, nous avons remarqué que les colonies des Lactobacilles isolées sont irrégulières érodées, de couleur crème de 1 à 3 mm de diamètre.

Lactobacillus fermente le glucose sans production de gaz (CO₂) donc elle est homofermentaire (Axelsson, 2004, Hammes et Hertel, 2006). Ce qui confirme nos résultats.

D'après les tests de dégradation des carbohydrates, nous avons remarqué que les souches identifiées comme *Lactobacillus plantarum* (A2 ; A3 ; A4 ; A5 ; A6 ; C1 ; C4 ; BD ; BE ; BF ; BG ; BH ; BI ; BJ ; BK ; BL) fermentent la majorité des sucres à l'exception de xylose.

Lactobacillus plantarum se distingue aisément de *Lactobacillus acidophilus* parce qu'elle ne fermente pas le mannitol. La souche A1 a été identifiée comme *Lactobacillus acidophilus*, et la souche C3 considéré comme *Lactobacillus casei / rhamnosus*, car elle fermente tous les sucres et ne se développe ni à 45°C ni à 63,5 °C (Guiraud, 2003). La répartition des genres et des espèces (même les sous espèces) est présentée dans la figure 21. Les *Lactobacillus* représente 33.4% des souches isolées, suivis par les Lactocoques avec un taux de 33.3% et enfin les leuconostoc avec 31.5%.

L'effet antibactérien : Cette étape a permis de recenser des souches possédant l'activité antibactérienne intéressante. Les bactéries lactiques métabolisent le lactose en acide, abaissent ainsi le pH et créant un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes et des microorganismes d'altération.

L'inhibition des microorganismes pathogènes et la flore de contamination des aliments sont un souci important en ce qui concerne la transformation des produits alimentaires. Les microorganismes pathogènes d'importance incluent *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Un total de 54 souches bactériennes avec des effets antagoniques sur *E. coli* et *Staphylococcus aureus* a été détecté. Cette interaction positive indique l'inhibition de la croissance des deux bactéries pathogènes testées (*E. coli* et *S.aureus*) par l'apparition des zones d'inhibition (Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Les résultats montrent que les souches testés de *L. mesenteroides* subsp *mesenteroides* (A, B, C, F, G, H, B4, B5, B6, 8) et *L. mesenteroides* subsp *dextranicum* (D) et *L. paramesenteroides* (3, 5, 6, 12) ; et les autres *Leuconostocs* (B8, 14) ainsi que *Lactobacillus plantarum* (C1, C4, A2, A3, A4, A5, A6, BD, BE, BF, BG, BH, BI, BJ, BK, BL) et *L. acidophilus* (A1) et *Lb. casei / rhamnosus* (C3) présentent une activité inhibitrice plus au moins prononcée sur les deux bactéries pathogènes avec un diamètre entre 7 et 17 mm.

Les souches de *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis* testées ont également montré une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) avec un diamètre entre 7 à 15 mm. Ces résultats indiquent que nos bactéries sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

La majorité des souches sont actives sur les bactéries à Gram positif mais pas tous sur les bactéries à Gram négative (Onda et al., 2003).

Aslam et Qazi., (2010) Suggèrent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques. Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyl, et le peroxyde d'hydrogène.

L'antibiogramme a été effectué sur les différentes souches de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, et *Lactobacillus* ; après la mesure des diamètres des zones d'inhibition de croissance, les résultats montrent que la plupart des souches sont résistant à la majorité des antibiotiques.

Deuxième partie

2.6. Valeur nutritionnelle du chou avant et après fermentation

2.6.1. Variations du pH et d'acidité au cours de fermentation

Il y'a une fonction inverse entre les valeurs du pH et d'acidité en fonction de la durée de fermentation. En effet, quand le pH diminue, l'acidité augmente progressivement avec un taux de 1.65%.

La fermentation est due, au départ à des ferments hétérolactiques (*Leuconostoc mesenteroides*). La production d'acide lactique va inhiber les levures et autres germes osmophiles. À 1% d'acidité, la fermentation est poursuivie par *Lactobacillus plantarum* et d'autre germes peuvent avoir une influence favorable s'ils restent en faible proportion, *Flavobacterium rhenans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, peuvent participer à l'élaboration d'arômes souhaitables (Guiraud, 2003)

nous avons remarqué une diminution des valeurs de pH et d'acidité où le caractère du milieu devient plus acide après l'ajout de sel (2 % de sel ajouté). Cet abaissement est justifié par la présence des cations Na^+ qui augmente dans l'ordre de concentration de sel et en fonction du temps (Robinson, 1929).

Le rôle de salage se caractérise principalement dans la prolongation de la durée de conservation du produit vis-à-vis les conditions de fermentation notamment la température. L'addition de sel (chlorure de sodium) ainsi que sa distribution uniforme dans les fibres de chou, est l'un des points de contrôle critiques dans la production de choucroute. Non seulement le développement des conditions anaérobies et le type et l'étendue de la croissance microbienne, mais aussi les propriétés sensorielles du produit final sont affectées par la quantité de sel utilisé (Farnworth, 2005).

Comme avec d'autres processus biologiques, la fermentation de la choucroute est influencée par la température. D'un point de vue sensoriel, les meilleurs résultats sont obtenus à des températures entre 15 et 20 °C. Des températures plus élevées provoqueront une production accélérée d'acide, ce qui conduit à des produits à saveur dite verte et immature. Si les températures sont moins de 10 °C entravent le début de la fermentation et favorisent la détérioration chou (Farnworth, 2005).

2.6.2. Analyses biochimiques et valeur nutritionnelle du chou avant et après fermentation

La figure 24 présente la valeur moyenne plus ou moins l'écart type des constituants de chou et de choucroute analysés. Ces résultats montrent la composition nutritionnelle de chou cru et de la choucroute à différents stades de fermentation. Ces valeurs ont été comparées avec celles publiées par Zee et *al.*, (1987) et la Fiche nutritionnelle Choucroute publiées par (USDA,2016).

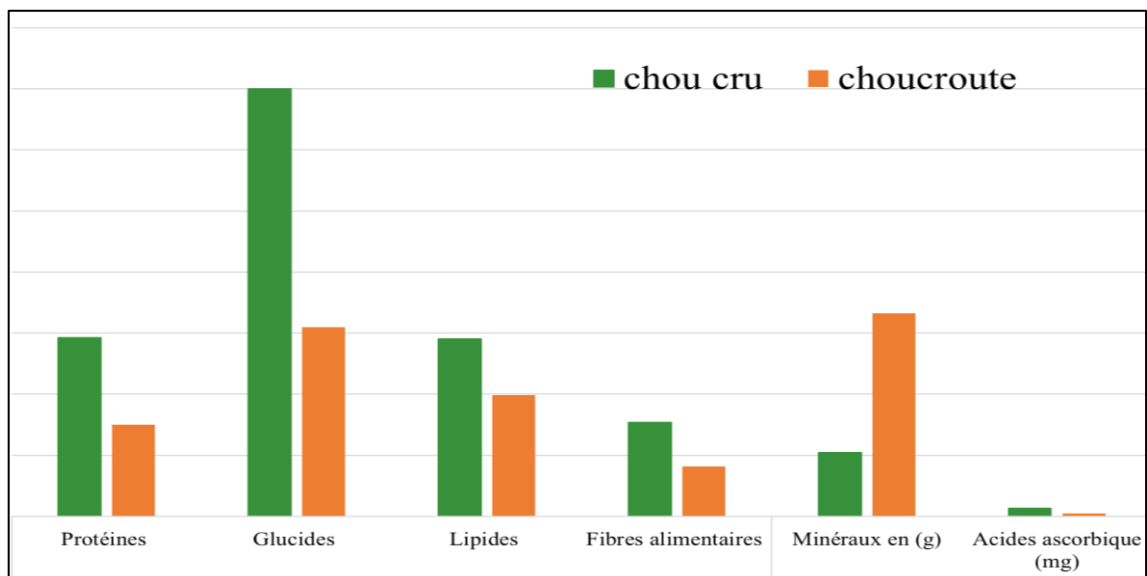


Figure 24 : Valeurs nutritives pour 100 g de chou et de choucroute.

D'après les résultats trouvés on peut conclure :

***Pour les macronutriments :**

-Le chou cru est un aliment principalement constitué d'eau. Ce qui le rend une source pour hydrater l'organisme. L'eau est l'élément le plus présent dans le corps humain, avec une moyenne de 70% du poids corporel. Les propriétés extraordinaires de l'eau liquide permettent aux molécules du vivant de réaliser les structures dynamiques associées à leurs fonctions et activités biologiques c'est un liquide unique dont les propriétés sont cruciales pour les processus de la vie (Simon, 2008).

-La teneur en glucides de chou cru est relativement importante, cependant, cette valeur diminue progressivement au cours de la fermentation, ceci due principalement aux dégradations apportées par les bactéries lactiques. Ces teneurs assurent un apport énergétique

très important et fournissent l'énergie pour les activités physiques quotidiennes et la fonction des organes notamment si l'apport de cet élément vient d'un élément bio et facile à digérer tel que la choucroute.

- la diminution du taux des fibres est justifiée par sa teneur principalement faible dans la matière première (le chou) ainsi par la dégradation microbiologique des fibres par la fermentation et le développement des microorganismes et la production des enzymes qui ont la capacité de dégrader ce nutriment.

-Nous avons également remarqué que les teneurs en protéines, en lipides de chou ont été également diminuées au cours de la fermentation par un taux pris de 60%. Cette dégradation révèle une activité métabolique importante des bactéries lactiques responsables de la fermentation, ceci peut aboutir à la formation de nouveaux métabolites secondaires très bénéfiques à la croissance notamment les acides aminés, acides gras, vitamines et les oligoéléments et pourquoi pas d'autres éléments bioactifs.

*** Pour les micronutriments**

- Le chou cru très est riche en acide ascorbique (vitamine C), car 100 g de chou blanc cru apporte l'équivalent de 77,6 % des Valeurs Nutritionnelles de Référence (VNR) en vitamine C. La choucroute assure aussi un apport de 24,5% des Valeurs Nutritionnelles de Référence (VNR) en vitamine C donc cet aliment transformé garde toujours son caractère bénéfique (APRIFEL, 2018).

- Les teneurs en minéraux et en oligoélément ont été augmentés progressivement aux cours de la fermentation. Ces valeurs sont à considérer comme des ordres de grandeur, susceptibles de varier selon les variétés, la saison, le degré de maturité, les conditions de culture (APRIFEL, 2018).



Conclusion

Conclusion

Les bactéries lactiques sont les microorganismes les plus dominants retrouvés au cours de la fermentation des aliments, leurs principales fonctions comprennent la production d'acides organiques, d'alcool, et des composés aromatiques ainsi que d'autre effet tel que l'inhibition des levures, et des microorganismes pathogènes, l'amélioration de la qualité nutritionnelle. Ce sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières notamment végétales d'où on s'est intéressée, et pour la première fois en Algérie, à : fermenter un légume très répandu ; le chou, caractériser sa flore lactique et évaluer sa valeur nutritionnelle.

- la choucroute a été préparée à base de chou provenant de la wilaya de Ain Defla, ou nous avons procédé deux fermentations, la première jusqu'à 39 jours à température ambiante et la deuxième jusqu'à 21 jours à 18°C.

- l'identification des souches a été réalisée après une série de sélection et de purification pour la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et biochimiques des 54 souches apparentées à trois genres *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Lactobacillus*.

- nous avons constaté que la fermentation est due, au départ (7jours) à des ferments hétérolactiques *Leuconostoc*, suivie par *Lactococcus* (21 jours) et enfin par *Lactobacillus* (39 jours). Nous avons également montré que la température est un facteur déterminant dans la répartition des espèces dans les deux fermentations réalisées.

- au cours de ce travail, différentes caractéristiques des souches isolées ont été appréciées et se sont montrées satisfaisantes pour une utilisation en agro-alimentaire à savoir la thermorésistance, la production de dextrane sur milieu MSE, la production d'acétoïne et la fermentation de citrate.

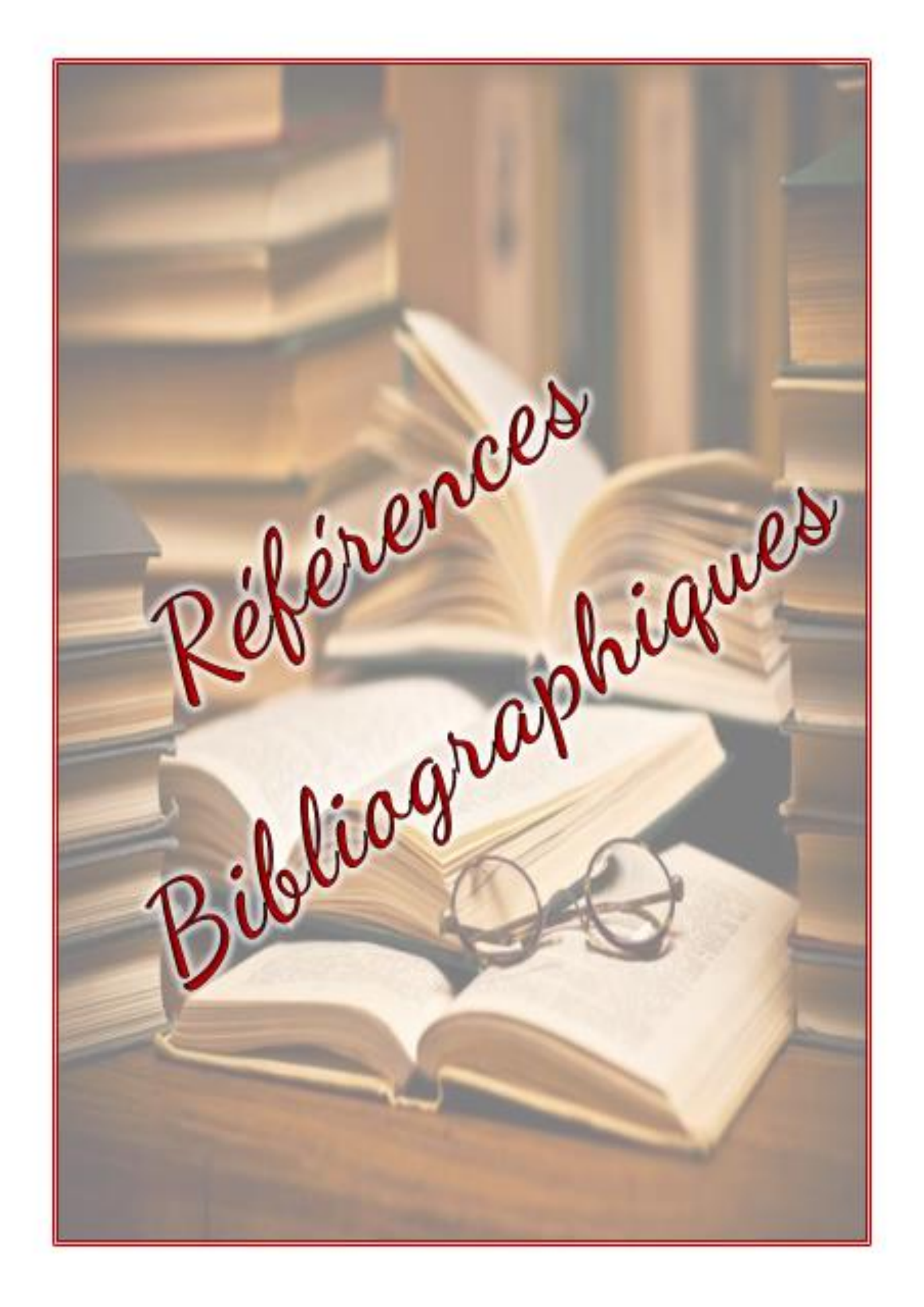
- La capacité de produire des substances inhibitrices contre des souches pathogènes *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et *Escherichia coli* a été également déterminé. L'antagonisme a montré l'effet inhibiteur de nos souches vis-à-vis les souches pathogènes avec des zones d'inhibitions allant de 7 à 17 mm.

- les analyses chimiques et biochimiques du chou avant et après fermentation nous a permis de conclure que notre aliment fermenté est de bonne qualité nutritionnelle et qui peut construire une source riche en minéraux, vitamines, fibres alimentaires, C'est aussi une bonne

source de bactéries lactiques connues par leur statut GRAS et qui peuvent être des probiotiques.

En perspectives de ce travail, la possible utilisation des légumes fermentés (dans ce cas-là la choucroute) et de leur flore lactique pourra être étudiée en d'autres points :

- Réaliser une culture de légume (chou) biologique ;
- Pousser l'identification des souches à l'échelle moléculaire ;
- Il est intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les souches lactiques ;
- L'enjeu à long terme, surtout pour l'agro-industrie est de trouver un moyen naturel (bactéries lactiques) de diminuer l'utilisation des conservateurs ;
- Mettre en évidence les vertus des légumes fermentés (choucroute) par des méthodes d'analyses plus sophistiquées.



*Références
Bibliographiques*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ❖ **Aasen I. M., S. Markussen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson, and K. Naterstad,** “Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 87, no. 1-2, pp. 35–43, 2003.
- ❖ **Adjélé Eli Wilson** .2011. Recherche d’isothiocyanates à intérêt fonctionnel technologique chez les Brassicacées. Thèse de doctorat. Université strasbourg.
- ❖ **Ana-Maria Hossu¹, Mihaela Scripcariu², Cristiana Radulescu¹, Elena Irina Moater¹, Ionica Ionita¹,** 2006 déterminations chromatographiques, spectrophotométriques, et titrimétrique de vitamine C dans pharmaceutiques Vol. VII (1) ISSN 1582-540X 233.
- ❖ **AOAC.** 1984. Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- ❖ **APRIFL:** Agence pour la Recherche et l’Information en Fruits et Légumes, Références nutritionnelles Chou blanc 2018.
- ❖ **Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J. et Lindgren S.E. 1989.** Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.
- ❖ **Axelsson L.T. 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.

B

- ❖ **Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D.E., Tornadijo M.E. et Kihal M. 2004.** Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat’s milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 3: 72-78.
- ❖ **Bekhouche F. et Boulahrouf A.,** 2005. Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d’élevage de Constantine. *Sciences & Technologie.*, 23: 38-45
- ❖ **Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R. 1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
- ❖ **Bensalah Farid,** 2006. Identification et caractérisation moléculaire des bactéries lactiques basées sur les techniques d’amplification de séquences spécifiques d’ADN par la méthode PCR. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Génétique. Université d’Oran Es-Senia
- ❖ **Bergeret, B.** 1957 Teneur en acide ascorbique de quelques aliments du sud caméronien Etude critique des différentes méthodes de dosage. *La revue médecine tropicale.* pp 17-2.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Bissonnette F., Labrie S., Deveau H., Lamoureux M. et Moineau S., 2000.** Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 620-627.
- ❖ **Björkroth J. et Holzapfel W. 2003.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York, Springer-Verlag. *Epub March*. 28.
- ❖ **Björkroth J., Holzapfel W.H. 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella* in : *The Prokaryotes. Vol 4.* Springer, pp 267-319.
- ❖ **Bottazzi V. et Dellaglio F. 1967.** Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
- ❖ **Burrow C.D., Sandine W.E., Elliker P.R. et Speckman C. 1970.** Characterization of diacetyl negative mutants of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 53: 121-125.

C

- ❖ **Caplice E. et Fitzgerald G.F. 1999.** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- ❖ **Carr F.J., Chill D. et Maida N. 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 4, 281-370.
- ❖ **CEDUS :** Centre d'études et de documentation du sucre, 2012. Collection Sucre et santé Digestion et métabolisme des glucides. www.sucre-info.com consulté le 26/06/2018
- ❖ **Chloé Simon,** département d'Eau-Biologie, cour : L'EAU DANS L'ORGANISME HUMAIN.26/09/2008. 1/9 consulté le 27/05/2018.
- ❖ **Collins M.D.2009.** Genus *Vagococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The firmicutes. Second Edition. Volume Three.* Springer.
- ❖ **Cogan T.M. 1986.** The leuconostocs: Milk products. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods*, *CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 25-40.

D

- ❖ **Davidson P.M., Post L.S., Braner A.L. et Mc Curdy A.R. 1983.** Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Foods.* eds. Davidson, *P.M. and Braner, A.L. Marcel Dekker Inc., New York.* pp. 385-392.
- ❖ **Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. et Ross P. 2006.** Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- ❖ **Delorme C., 2008:** Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 126: 274–277.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bacteriol*, 23, 130-135.
- ❖ **Diététistes de canada 2017.** www.dietetistes.ca. Fichier canadien sur les éléments nutritifs – version 2015" <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index-fra.php>
- ❖ **DeVos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whiteman W. B. 2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Diep, D.B., NES, I.F., 2002.** Ribosomal peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3, 107–122.
- ❖ **Doumandji A., Hellal A., Saidi N., 2010.** Purification de la bactériocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47
- ❖ **Dworkin I. and Gibson G. 2006.** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173: 1417–1431.

E

- ❖ **Earnshaw R.G. 1992.** The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. ed. Wood B.J.B. Elsevier *Appl. Sci.* London and New York. pp. 211-232.
- ❖ **Eichholtz, F., Die Biologie der Milchsäure und Ihre Entstehung in Vegetabilien chem Materiel**, 2nd ed., Eden-Stiftung, Bad Soden, 1975.
- ❖ **Eklund T. 1989.** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier *Applied Science*, London, pp. 161-200.
- ❖ **EPSIC.1999,** TENEURS EN NUTRIMENTS ET VALEUR ENERGETIQUE DES DENREES

F

- ❖ **Farber J.M. 1991.** Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. *J. Food Prot.* 54: 58-70.
- ❖ **Farnworth. Edward R. 2005.** Hand book of fermented functional foods. 343-357. ISBN: 0-8493-1372-44.
- ❖ Fiche nutritionnelle Choucroute, U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016" <https://www.usda.gov/>
- ❖ **Fox P.F. et Lane C.N. 2000.** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy. J.* 5: 720-730.
- ❖ **Franciosi Elena, Settanni Luca, Cavazza Agostino, Poznanski Elisa, 2009.** Biodiversity and

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.*, 19: 3-11

G

- ❖ **Garneau, S. N. I. Martin, and J. C. Vederas**, “Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria,” *Biochimie*, vol. 84, no. 5-6, pp. 577–592, 2002.
- ❖ **Gill A.O. et Halley R.A. 2003**. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.
- ❖ **Gould G.W. 1991**. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. eds. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York. pp. 461-483.
- ❖ **Guessas B., Hadadji M., Saidi N. et Kihal M. 2006**. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.
- ❖ **Guignard, J.-L; Dupont, F.** *Abrégés de botanique systématique moléculaire*; 13e éd. Editions Masson, 2004.
- ❖ **Guiraud J.P. 2003**. Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc, Dunod*. Paris. 90-292.

H

- ❖ **Hadef S.. 2012**. Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- ❖ **Hammes W.P., Hertel C., 2006**. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes.*, 4: 320-403
- ❖ **Haytowitz, D.B. et Matthews, R.H. 1984**. Composition of Foods: Vegetables and Vegetable Products (raw, processed and prepared). Agriculture Handbook No 8-11, U.S. Department of Agriculture, Washington, De.
- ❖ **Helander I.M., Von Wright A., Mattila-Sandholm T.M. 1997**. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends. Food. Sci. Technol.* 8(5):146-50.
- ❖ **Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A. and Caubet R.. 2007**. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.
- ❖ **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Blotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guedon E., Monnet V., Renault P. and Kleerebezem M.. 2005**. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* 29:435-463.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Holzappel W.H., Franz C.M., Ludwig W. and Dicks L.M.T. 2009.** Genus *Pediococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.
- ❖ **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011.** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407
- ❖ **HOWARD W. ROBINSON, 1929.** The influence of neutral salts on the ph of phosphate buffer mixtures From the Depadment of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville.

I

- ❖ **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. and Karam N.E. 2009.** Lactic acid bacteria from 'Sheep's Dhan', a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 60(2): 177-183.

J

- ❖ **Jacobsen T., Budde B.B. et Koch A.G. 2003.** Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *J. Appl. Microbiol.* 95: 242-249.
- ❖ **Jay M.J. 1996.** Modern Food Microbiology, 5th Edition, Chapman and Hall, New York.
- ❖ **Jozala A.F., de Lencastre Novaes L.C., Cholewa O., Moraes D. et Penna T.C.V. 2005.** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 3, 262-265.

K

- ❖ **Kacem M., Zadi-Karam H., Karam N-E., 2002.** Bactéries lactiques isolées de lait de vaches, de brebis et de chèvre de l'Ouest Algérien. *Renc. Rech. Ruminants*, 9: 375
- ❖ **Karam N-E., Zadi-Karam H., Lazreg L., Dalache F., 2008.** Bactériocines de bactéries lactiques: caractérisation d'une bactériocine d'*Enterococcus* BO2. *Renc. Rech. Ruminants.*, 15: 72
- ❖ **Kempler G.M, Mc Kay L.L. 1980.** Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 956-927.
- ❖ **Kong S. et Davison A.J. 1980.** The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.
- ❖ **Klaenhammer TR. 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- ❖ **Kulshrestha D.C. et Marth E.H. 1974.** Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* 37: 510-516.

L

- ❖ **Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. and Wright A.V. 2012.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- ❖ **Lancefield R.C. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571–595.
- ❖ **Larpent S.P. 1997.** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. *Ed. Tech et Doc*, Lavoisier, Paris.
- ❖ **Leveau J-Y., Bouix Mrielle, De Roissart H., 1991.** La flore lactique **In** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-18
- ❖ **Lilly D.M. et Stillwell R.H. 1965.** Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147: 747-748.
- ❖ **Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. 1990.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- ❖ **Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L. et Moreno B. 2000.** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17: 23-32.

M

- ❖ **Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J. et Schnürer J. 2003.** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Let.* 219: 129-135.
- ❖ **Manas Ranjan Swain, Marimuthu Anandharaj, Ramesh Chandra Ray, and Rizwana Parveen Rani.2014.** Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. Volume 2014, Article ID 250424, 19 pages.
- ❖ **MARION M. BRADFORD, 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantisation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248-254 (1976).
- ❖ **Mazumdar, B.C. and K. Majumder, 2003.** Methods on physico-chemical Analysis of Fruits. University college of Agriculture, Calcutta University. 108-109.
- ❖ **Mayeux J.V., Sandine W.E. and Elliker P.R. 1962.** A selective medium for deting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science* 45:655-656.
- ❖ **Milliere J.B., Mathot A-G, Schmitt P., Divies C., 1989.** Phenotypic characterization of

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Leuconostoc species. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 529-542.

- ❖ Mosoni P. 2014 Dégradation des fibres alimentaires par le microbiote colique de l'Homme. *Innovations Agronomiques* 36 (2014), 83-96 INRA, UR454 Microbiologie, F-63122 Saint Genès Champanelle Correspondance : pascale.mosoni@clermont.inra.fr.
- ❖ **Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M. 2010.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing*. 13.
- ❖ **Muhammad Shahnawaz, Saghir Ahmed Sheikh and S.M. Nizamani,** 2009 Determination of Nutritive Values of Jamun Fruit (*Eugenia jambolana*) Products. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (8): 1275-1280, 2009 ISSN 1680-5194.
- ❖ **Myron A. Elliott, Alfred L. Sklar, and S. F. Acree,** 1941. Rapid method for determining ascorbic acid concentration, Part of *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, Volume 26.

N

- ❖ **Nielsen S.** 2014. *Food Analysis*. Springer Science & Business Media, Determination of total acidity of food BCH 445- practical note
- ❖ **Novel G.,** 1993. Les bactéries lactiques *In* *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., Bouix M. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp : 170-374

O

- ❖ **Orla -Jensen S. 1919.** The lactic acid bacteria. A.F. hostand son, Koenighichen Hof Boghamdel, Copenhagen.
- ❖ **Naska, A. Fouskakis, D. Oikonomou, E. Almeida, M. D. V. Berg, M. Gedrich, K. Moreiras, O. Nelson, M. Trygg, K. Turrini, A. Remaut, A. M. Volatier, J. L.;** Trichopoulou, A. Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr* 2005, 60, 181-190.

P

- ❖ **Parente E., Ricciardi A. et Addario G. 1994.** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 388-394.
- ❖ **Pierre Hinard.** 2016 L'altération des aliments, <http://www.genialimentaire.com>, consulté le 26/06/2018.
- ❖ **Pilet M.F., Magras C. et Federighi M.. 2005.** Bactéries lactiques. *In* : bactériologie Alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
- ❖ **Pitrat, M.; Foury, C.** *Histoires de légumes: des origines à l'orée du XXIe siècle*; Editions

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Quae, 2003.

- ❖ **Prescott. L, Harley. L and K lein.D.**1999.Microbiologie by the MC. Graw-Hill companies, Inc, Paris. p 986. ISBN: 2-8041-4256-6

R

- ❖ **RACHID SALGHI**, 2008. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES I, Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir.
- ❖ **Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. et Cornwell P.E.** 1984. Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.

S

- ❖ **Salminen S., Ouwehand A. et von Wright A.** 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3rd ed. *Marcel Dekker*. New York. 375-395.
- ❖ **Sanz B., Selgas D., Parejo I. et Ordòñez J.A.** 1988. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 199-205.
- ❖ **Sargent, I, Henderson, R.J. Tocher, D.R.** 1989. The lipids. *In: Fish Nutrition*. IE. Halver (Eds), Academic Press, Inc., 153-218.
- ❖ **Schillinger U. et LückeK.** 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- ❖ **Schleifer K.H. et Ludwig W.** 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. *In The genera of lactic acid bacteria*, Edited by B.J.B. Wood & W. H. Holzapfel. London: *Blackie Academic and Professional*. pp. 7-18.
- ❖ **Stiles M.E. and Holzapfel W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- ❖ **Settanni L .and A. Corsetti**, “Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 121, no. 2, pp. 123–138, 2008.
- ❖ **Stamer, J.R., Stoyla, B.O., and Dunckel, B.E.**, Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation, *J. Milk Food Technol.*, 34, 521–525, 1971.
- ❖ **Samelis J., Maurogenakis F. et Metaxopoulos J.**, 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23: 179-196

T

- ❖ **Talarico T.L., Casas I.A., Chung T.C. et Dobrogosz W.J.** 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1854-1858.
- ❖ **Tamime A.Y...** 2002. Microbiology of starter cultures. *In: Dairy microbiology handbook*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(Robinson R.K.). *3e Ed.*, John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

- ❖ **Terres oléopro**, 2016. À la découverte des Protéines Végétales, la filière française des huiles et protéines végétales.
- ❖ **Teuber Michael, Geis Arnold**, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228.
- ❖ **Thompson J. et Gentry-Weeks C.R.** 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1: 239-290.
- ❖ **Tolonen, M. Rajaniemi, S. Pihlava, J.-M. Johansson, T. Saris, P. E. J.; Ryhänen, E.-L.** Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology* **2004**, *21*, 167-179.
- ❖ **Trichopoulou, A.** Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr* **2005**, *60*, 181-190

V

- ❖ **Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K. and Swings J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60:407.

W

- ❖ **Who** 1974. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *WHO Food Additives*. 5: 461-465.

Z

- ❖ **Zarour K.** 2010. Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université D'Oran Es-Senia.
- ❖ **Zeel, D. Poirier, M. Cusson, A.G. Roberge' et J. Sevigny** .1987 Valeurs nutritives des fruits et légumes produits et consommés au Québec, pp. 350-356
- ❖ **Zhang H. et Cai Y.** 2014. Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. Springer Dordrecht Heidelberg New York London P: 535.



Annexes

ANNEXES

Milieux de culture

1. Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Polypeptone	10 g
Citrate de sodium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Glucose	20 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄	0,25g
MnSO₄	0,05 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
PH	6,2

➤ **Autoclavage** : 120°C/ 20 minutes.

2. Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g
Azide de sodium	0.075 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
PH	6,8

➤ **Autoclavage** : 120°C/ 20 minutes.

3. Milieux gélose au sang base :

Mélange spécial de peptones	23g
Amidon	1g
NaCl	5g
Sang frais	50ml
Agar	15g
PH	7,3

➤ **Autoclavage** : 120°C pendant 20 minutes.

ANNEXES

4. Milieu KMK (Kempfer et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5g
Glucose	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
PH	6,6

➤ Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C.

➤ **Au moment de l'emploi on ajoute :**

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

5. Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5 g
Lactose	2 g
L-arginine	4 g
Pourpre de Bromocrésol	0,05 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
PH	6,8

➤ **Autoclavage :** 120°C pendant 20 minutes.

6. Clark et Lubs :

Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	950ml

➤ **La réaction de Voges Proskauer (VP) :**

➤ Ajouter 10gouttes de VP1 et le même volume de VP2 ;

➤ Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.

➤ Attendre quelques min à 1 heure.

➤ **Réactif VP1 :** alpha naphthol (6g) +100ml alcool éthylique à 60%(conservé en flacon opaque au réfrigérateur). **Réactif VP2 :** Soude concentrée (ou de potasse).

ANNEXES

7. Eau Physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
PH	7,0

- Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.
- Tampon phosphate de sodium
- Solution (a) : 27.8g NaH₂PO₄ dans 100ml d'eau distillée.
- Solution (b) : 53.65g Na₂HPO₄ dans 100ml d'eau distillée.
- Tampon 0.1 M : 39ml solution (a) + 61 ml solution (b).
- Stérilisation à 110°C pendant 20mn

8. Gélose nutritif (GN)

Peptone	5 g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
PH	7

- **Autoclavage** : durant 15 min à 121°C.

9. Milieu de Moëller (Moëller, 1955)

Peptone	5g
Extrait de viande	5g
Glucose	0,5g
Pridaxal	5mg
Pourpre de bromocrésol	0,1g
Rouge de crésol	5mg
Eau distillée	1000ml
pH	6,4

- Le milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10g d'arginine. Stériliser 15 min à 120°C.

ANNEXES

10. Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH	7,4

➤ Autoclavage : 120°C, 20 min.

11. Bouillon nutritif

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure	5 g
pH	7,4

➤ Autoclavage : 120°C, 20 min.

12. Milieu Chapman

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
PH	7.4

➤ Autoclavage : 120° C, 20min

13. Bouillon MRS

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄	0,25 g
MnSO₄	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8

ANNEXES

14. Milieu MRS-BCP Sans Extrait De Viande

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄	0,25 g
MnSO₄	0,05 g
Pourpre de bromocrésol	0,025 mg
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8

- **Autoclavage** : 120°C, 20 min.

15. Lait bleu de Scharman 1%

Lait écrémé stérile	09ml
Bleu de méthylène à 1%	01ml
PH	7

- Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes.

16. Lait bleu de Scharman 3%

Lait écrémé stérile	07ml
Bleu de Méthylène	03ml
PH	7

- Stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 15 minutes.

17. Les sucres

Sucre	20g
Eau distillé	100 ml

- Tyndallisation « 70°C pendant 30 minutes à trois reprises »