

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur en
Sciences de la mer
Spécialité : Aquaculture

Thème :

Formulation de milieux de culture à base
de coproduits de la pêche et lactosérum :
croissance de *Lactobacillus brevis*.

Présenté par :

➤ Zakaria Aichouche

Soutenu le 30/10/2014 devant le membre de jury suivant :

M ^{me} Djeghri. B	Professeur	ENSSMAL	Promotrice
M ^f Refes. W	Maitre de conférences	ENSSMAL	Président
M ^{elle} Amrouche. L	Maitre assistante	ENSSMAL	Examinatrice

Promotion 2013 / 2014

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, Le tout Puissant pour le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **Pr.Djaghri Baida** qui m'a honorée en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Merci de m'avoir guidée avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Mes vifs remerciement d'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

- Monsieur **Refes Wahid.**, qui me fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance.
- M^{elle} **Amrouche Lynda.**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire, pour leur aide et surtout leur disponibilité.

Enfin, j'exprime mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents, mon trésor dans cette vie

Mes frères : Abdrrahamen, Abdelaziz et Abdelwaheb.

Mes sœurs : Nour elhouda et Khawthar.

A binôme Sabrina et à toute sa famille

A mes Amis, en particulier : Djamel, Nour Eddine, Abd Nour,

Mounire, Djebe et Nora Ghazel.

Et à Kadi Abd Elakader et sa famille.

Zakaria

Sommaire

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviation.....
Introduction	10
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Valorisation des coproduits de la pêche.....	13
1.1 Définition des coproduits de la pêche.....	13
1.2 Différentes voies de valorisation des coproduits de poisson.....	13
1.2.1 Farines et huiles de poisson.....	14
1.2.2 Les hydrolysats.....	16
1.2.2.1 L'hydrolysats chimique.....	16
1.2.2.2 Les hydrolysats enzymatiques.....	16
a. Les autolysats.....	17
b. Les hétérolysats.....	17
Chapitre 2 : Généralités sur les bactéries lactiques.....	20
2.1 Définition.....	20
2.2 Habitat.....	20
2.3 Caractéristiques générales.....	20
2.4 Classification.....	20
2.5 Exigence nutritionnelles.....	22
2.5.1 Exigence en sources azotées.....	22
2.5.2 Exigences en vitamines.....	22
2.5.3 Exigences en minéraux.....	22
2.6 Rôles des bactéries lactiques.....	23
Chapitre 3 : Les milieux de culture des bactéries lactiques.....	26
3.1 Définition d'un milieu de culture.....	26
3.2 Composition d'un milieu de culture.....	26
3.2.1 Les extraits de levures.....	27
3.2.2 Les extraits de foie.....	28
3.2.3 Le Tween 80.....	28
3.3 Milieux de culture pour les bactéries lactiques.....	28

3.3.1 Milieux industriels pour la production de bactéries lactiques	28
3.3.1.1 Le lait.....	28
3.1.1.2 Le lactosérum	29
a. Définition et caractéristiques	29
b. Composition	30
3.3.2 Les milieux de laboratoire	31
3.3.2.1 Milieu MRS	31
3.3.2.2 Milieu M17	31

Partie II : Matériel et méthodes

2.1 Cadre d'étude.....	33
2.2 Appareillage utilisé.....	33
2.3 Matériel biologique	33
2.3.1 Les coproduits de poissons	33
2.3.2 La souche de lactobacille.....	33
2.4 Préparation des milieux de culture	34
2.4.1 Obtention d'hydrolysate des coproduits.....	34
2.4.2 Formulation des milieux de culture	36
2.4.3 Evaluation du potentiel des milieux de culture formulés.	37
2.4.3.1 Préparation de pré-culture	37
2.4.3.2 Mise en culture de la souche.....	37
2.4.3.3 Préparation des dilutions	37
2.4.3.4 Ensemencement	38
2.4.3.5 Dénombrement	38

Partie III : Résultat et discussion

3.1 Résultats	40
3.1.1 Description des milieux de culture	40
3.1.2 Evaluation du potentiel des milieux de culture mis au point.....	40
3.1.2.1 Aspect microscopique des cultures.....	40
3.1.2.2 Aspect macroscopique des cultures	41
3.1.2.3 Dénombrement	41
3.2 Discussion.....	44
Conclusion	47
Bibliographique	49
Annexes.....	59

Liste des tableaux

Tableau 01 : Importance des minéraux dans le métabolisme des lactocoques	9
Tableau 02 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	11
Tableau 03 : Principaux Ingrédients entrant dans la composition des milieux de production de ferments lactiques.	13
Tableau 04 : Principaux composants du lait de vache	15
Tableau 05 : Composition chimique du lactosérum.....	16
Tableau 06 : Milieux gélosés permettant le dénombrement de bactéries lactiques.	17
Tableau 07 : Poids des échantillons des coproduits et volumes d'eau distillée ajoutée et volumes de filtrats obtenus	21
Tableau 08 : Rôles et concentrations des différents composés des milieux.....	21
Tableau 09 : Résultats du dénombrement de <i>Lb. brevis</i> sur les différents milieux	25
Tableau 10 : Composition de l'extrait de levure	Annexe

Liste des figures

Figure 01 : Principaux coproduits de poisson	2
Figure 02 : Proportion des différentes voies de valorisation des coproduits d'origine marine.....	3
Figure 03 : Production de farine et d'huile de poisson.....	4
Figure 04 : L'utilisation mondiale de farine (a) et de l'huile de poisson (b).....	4
Figure 05 : Procédé d'obtention des hydrolysats	20
Figure 06 : Aspect d'un milieu de culture formulé	24
Figure 07 : Observation microscopique de <i>Lb. brevis</i> après coloration de Gram (X 100).	24
Figure 08 : Résultats de la culture de <i>Lb. brevis</i> sur les milieux (L1) et (L2).....	26
Figure 09 : Résultats de la culture de <i>Lb. brevis</i> sur les milieux (L3) et (L4).....	26
Figure 10 : Résultats de la culture de <i>Lb. brevis</i> sur les milieux (L5) et (L6).....	27
Figure 11 : Résultats de la culture de <i>Lb. brevis</i> sur le milieu (V3).....	28
Figure 12 : Aspect de la culture (à 37°C pendant 18 h) de <i>Lb. brevis</i> sur bouillant MRS.....	Annexe
Figure 13 : préparation des tubes de conservation	Annexe

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

AA : Acides aminés.

BL : Bactéries lactiques.

Co₂ : oxyde de carbone.

D.O : Densité optique.

EPS : Exopolysaccharides.

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture).

g : gramme.

G +C : Guanine + Cytosine.

GRAS : Generally Reconized As Safe (généralement considérées comme sûres).

h : heure.

Ifremer : Institut Français de recherche pour exploitation de la mer.

l : litre.

Lb : Lactobacillus.

min : Minute.

ml : Millilitre.

MRS : Man, Rogosa et Sharpe.

NaOH : hydroxyde de sodium.

OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé.

pH : Potentiel hydrogène.

Sub : subdivision.

TTC : Chlorure de tétrazolium.

UFC : Unité formant colonie.

Introduction

Les industries de la pêche et de l'aquaculture génèrent une quantité considérable de coproduits (têtes, viscères, peaux et arêtes) au cours des opérations de transformation. On estime que 50 % du poids de la production mondiale de poissons sont écartés comme coproduits lors ces opérations de transformation (**Kristinsson et Rasco, 2000**).

La majeure partie de ces coproduits est rejetée directement dans l'environnement, ce qui présente des risques pour la pollution et la santé (**Archer, 2007**).

Cependant, ces déchets renferment plusieurs substances méritant d'être valorisées : On peut citer entre autres protéines, lipides, chitine, astaxanthine et éléments minéraux... (**Heu et al., 2003**).

La valorisation des coproduits permettrait, en plus de respect de l'environnement. Elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production d'autres produits.

L'hydrolyse enzymatique appliquée aux coproduits dans le but de produire de nouveaux actifs constitue l'une des voies possibles pour mieux valoriser ces ressources.

La production des bactéries lactiques nécessite des milieux riches, complexes et relativement coûteux.

Actuellement, différentes matières premières peu coûteuse servent de substrat pour la culture des bactéries lactiques : c'est le cas du blé, des mélasses, des dattes, du lactosérum. Pour la production de ferments, le milieu de culture constitue le principal coût de production de la culture cellulaire. Il est donc essentiel de trouver des matières premières de bonne qualités nutritionnelles et technologiques, de faible prix et disponible sur le marché.

Ce travail s'inscrit dans cette optique et porte sur la formulation des milieux de culture à base de coproduits de la pêche et de lactosérum pour la croissance de bactéries lactiques.

L'objectif principal de ce travail est :

- Valorisation des coproduits de poisson.
- Valorisation du lactosérum.
- Production de milieu de culture pour la croissance de la souche *Lactobacillus brevis*.

1. Valorisation des coproduits de poisson

1.1 Définition des coproduits de poisson

Les coproduits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. (Randriamahatody, 2011). Ils sont encore appelés 3^{ème} filet. Ils sont obtenus dans la chaîne de transformation de la filière pêche et aquaculture à plusieurs niveaux. Les producteurs sont les pêcheurs, les mareyeurs, les conservateurs, les sauteurs-saurisseurs et les industries de transformation de produits piscicoles et marins (Andrieux, 2004). Les coproduits sont principalement composés de têtes, de viscères, de peaux et d'arêtes. Ils représentent entre 30 et 60% de l'animal (Dumay, 2006). On estime que 50% du poids de la production mondiale de poissons sont écartés comme coproduits lors des opérations de transformation (Kristinsson et Rasco, 2000).

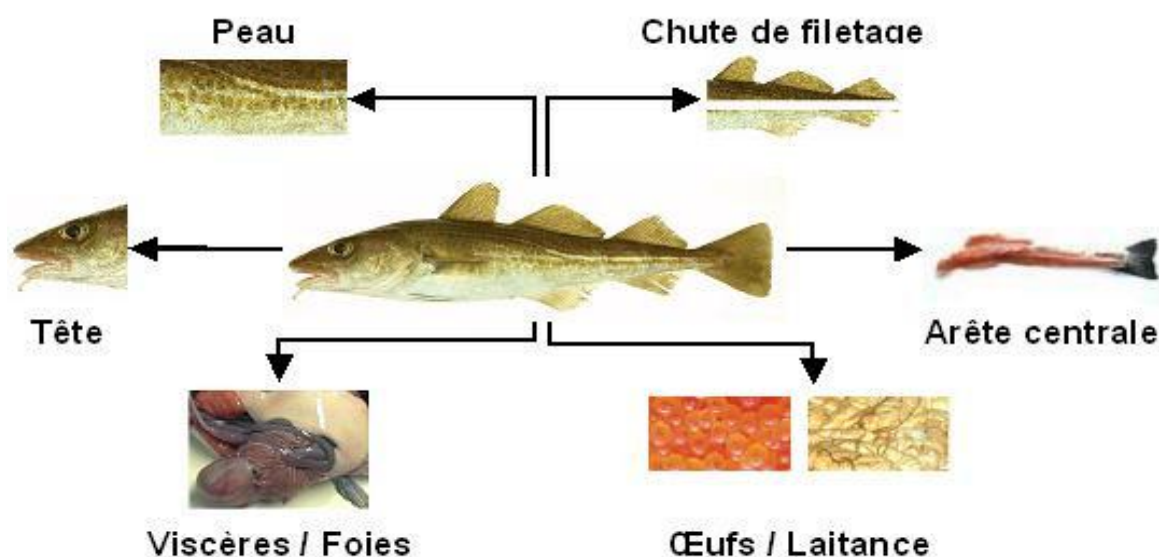


Figure1 : Principaux coproduits de poisson (*Main fish by-products in Dumay, 2006*).

1.2 Différentes voies de valorisation des coproduits de poisson

La valorisation des coproduits permettrait, en plus du respect de l'environnement, de maximiser le profit des entreprises (Randriamahatody, 2011). Elle conduit à des produits dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, la nutraceutique et pharmaceutique, la cosmétique, le médical (Dumay, 2006). A partir d'un même type de coproduit (tête, viscères, arêtes, peau) il est possible d'obtenir différents produits dérivés (NGUYEN THI MY HUONG, 2009).

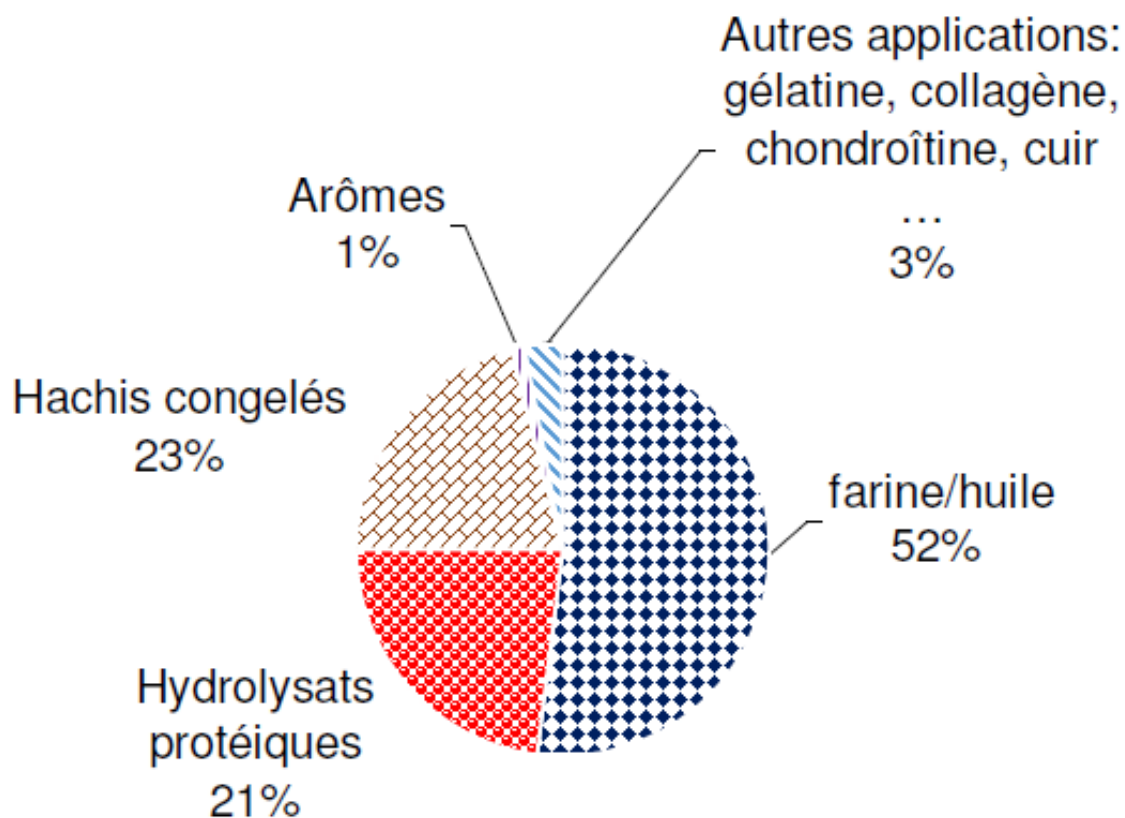


Figure 2 : Proportion des différentes voies de valorisation des coproduits d'origine marine (Andrieux, 2004).

1.2.1 Farines et huiles de poisson

Cette valorisation est actuellement la plus importante car les coproduits peuvent être utilisés sans distinction. Elle ne nécessite aucun tri, seule la distinction des coproduits issus de poissons sauvages ou poissons d'élevages doit être faite (Dumay, 2006). La production mondiale est estimée à 6 millions de tonnes pour la farine et 896 000 tonnes pour l'huile de poissons (FAO, 2009). Ces produits sont principalement destinés à l'alimentation animale (Gbogouri, 2005). Une proportion de 56% de la production de farine et 87% d'huile est destinée à l'aquaculture (FAO, 2009).

Les huiles et les farines de poissons sont issues du même procédé de transformation. Ce procédé vise à séparer les fractions solides, huileuses et aqueuses de la matière première, en minimisant au mieux les coûts et en obtenant des produits de la meilleure qualité possible (Dumay, 2006).

D'une manière générale, les farines et les huiles de poissons sont préparées à partir d'espèces de faible valeur (anchois, sardine, hareng,...), mais en raison de la diminution de

quantités disponibles de telles espèces, les entreprises se tournent vers d'autres sources de matières premières telles que les coproduits (**Johnson, 2002**).

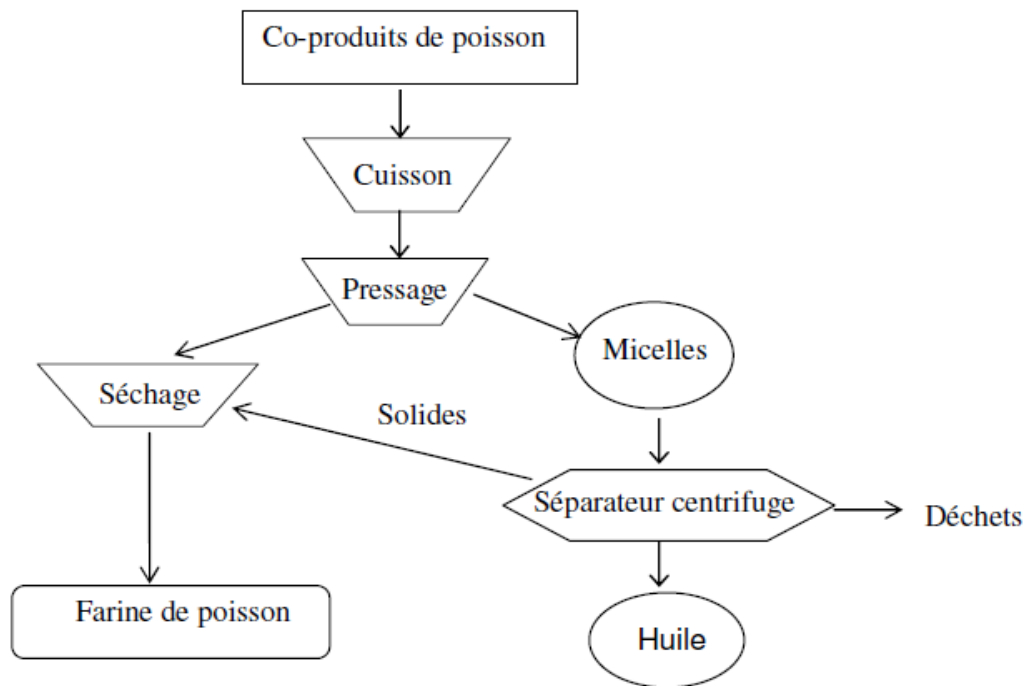


Figure 3 : Production de farine et d'huile de poisson (**Pigott et Tucker, 2003**)

Les farines contiennent en général de 65 à 67% de protéines et un maximum de 12% de lipides. Elles possèdent de bonnes valeurs nutritives et une grande teneur en acides aminés essentiels mais sont peu solubles, possèdent peu de propriétés fonctionnelles et peuvent causer des inconvénients liés à leur forte teneur en sels minéraux (**Denes, 2006**).

Les principaux pays producteurs de farine et d'huile de poisson sont le Pérou, le Chili, le Danemark et la Norvège (**FAO, 2009**).

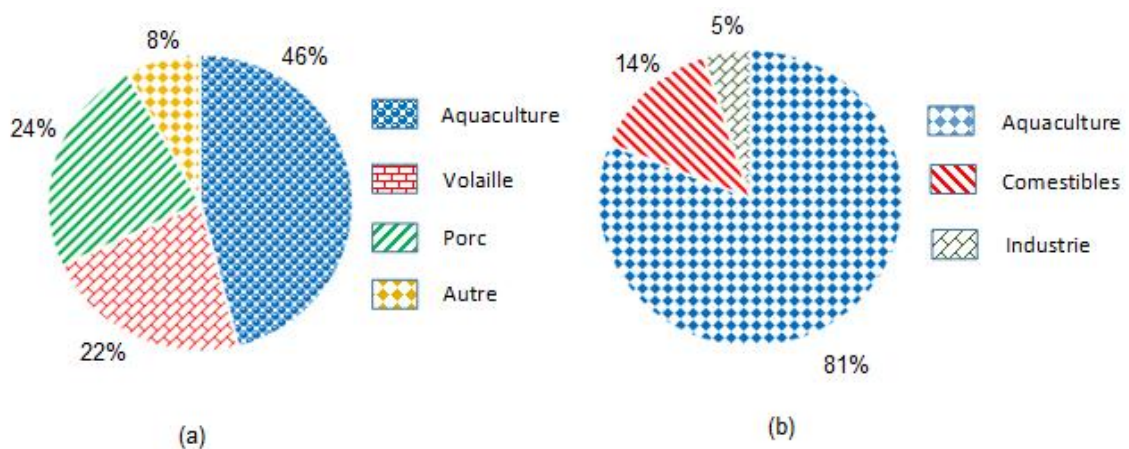


Figure 4 : L'utilisation mondiale de farine (a) et de l'huile de poisson (b) (**Schipp, 2008**)

1.2.2 Les hydrolysats

Les hydrolysats sont le résultat de la digestion partielle des peptides par hydrolyse protéolytique de poissons entiers ou de coproduits (NGUYEN THI MY HUONG, 2009). L'hydrolyse va découper les protéines, au niveau des liaisons peptidiques, en molécules de plus petites tailles : polypeptides, peptides et acides aminés (Ifremer, 2012).

L'hydrolyse nécessite, pour couper les protéines, un acide, une base ou une enzyme. Il s'agit alors d'une hydrolyse chimique ou d'une hydrolyse enzymatique (Ifremer, 2012).

1.2.2.1 L'hydrolysat chimique

L'hydrolyse chimique est la plus ancienne et peut être conduite en milieu acide (HCL ou H₂SO₄) ou en milieu alcalin (Na-OH) dans des conditions drastiques telles que des températures de l'ordre de 100 °C et des fortes concentrations de soude ou d'acide (NGUYEN THI MY HUONG, 2009). L'hydrolyse acide est plus utilisée que l'hydrolyse basique. L'hydrolyse chimique est peu coûteuse, assez simple mais non spécifique (coupure des liaisons peptidiques quelque soit la séquence des acides aminés). Elle est donc peu reproductible (taille, composition et fonctionnalités variables des peptides obtenus).

De plus, les conditions d'hydrolyse (températures élevées et condition de pH extrêmes) altèrent les propriétés des peptides et détruisent certains acides aminés comme le tryptophane qui est un acide aminé essentiel (Ifremer, 2012).

1.2.2.2 Les hydrolysats enzymatiques

L'hydrolysat des poissons sont obtenus par hydrolyse enzymatique des coproduits (Gbogouri, 2005). Elles sont des fractions à teneur protéique élevée obtenues soit par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) soit par hétérolyse (avec addition d'enzymes exogènes). Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines (NGUYEN THI MY HUONG, 2009). Les hydrolysats ont donc les avantages d'être très digestes et d'avoir une haute qualité nutritive (Dumay, 2006). Ils sont utilisés à 90 % en aquaculture. Ils sont aussi destinés à l'alimentation des jeunes animaux d'élevage afin de favoriser leur croissance (Gbogouri, 2005).

L'hydrolyse enzymatique présente l'avantage d'être plus facilement contrôlable que l'hydrolyse chimique. Elle permet également de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et ne nécessite pas de traitement chimique pour éliminer l'agent

hydrolysant, l'enzyme étant simplement inactivée par un échauffement modéré (NGUYEN THI MY HUONG, 2009).

a. Les autolysats

Les autolysats sont obtenus principalement par l'action des enzymes protéolytiques endogènes du poisson, présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines) (NGUYEN THI MY HUONG, 2009).

Les autolysats sont produits par fermentation qui est une technique utilisée depuis des siècles pour la conservation des poissons (Randriamahatody, 2011). La prolifération bactérienne y est contrôlée par ajout de sucre et/ou de sel, déshydratant ainsi le produit (Roy et Durand, 1997). Les autolysats sont généralement liquides, assez visqueux, riches en acides aminés libres et en petits peptides (Ravallec-Plé, 2000). Ils sont utilisés aussi bien en alimentation humaine qu'animale (Lian *et al.*, 2005). Les produits fermentés peuvent être de plusieurs types (Dumay, 2006) :

- Sauces et pâtes de poisson orientales (Nuoc-Mam, Mam-Tom), pouvant être réalisées à partir de toutes les espèces de poissons et de crustacés, du moment que les enzymes soient suffisantes pour réaliser l'autolyse.
- Anchois salés et maturés d'origine basque et méditerranéenne.
- Produits venant des pays nordiques, essentiellement à base de hareng.

b. Les hétérolysats

En ce qui concerne les hétérolysats, ils sont obtenus par addition d'enzymes de différentes origines (végétale, animale, bactérienne...) aux coproduits (Randriamahatody, 2011). Les enzymes d'origine végétale les plus fréquemment employées sont la papaïne et la bromélaïne. Quant aux enzymes d'origine animale (porcine et bovine) les plus fréquentes sont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (NGUYEN THI MY HUONG, 2009). Aujourd'hui les enzymes protéolytiques microbiennes, extraites des bactéries, de levures ou de moisissures sont les plus utilisées à l'échelle industrielle en raison de leur faible coût de production et de leur grande diversité (Frost, 1986).

De tels hétérolysats de poisson trouvent actuellement des applications dans de nombreux domaines tels que : la nutrition animale et humaine, la nutraceutique et la pharmaceutique (NGUYEN THI MY HUONG, 2009).

▪ Nutrition animale et humaine

Depuis une quarantaine d'années, les industriels s'intéressent aux hydrolysats de poisson pour leur intérêt nutritionnel et leur incorporation dans des régimes spécifiques (diététiques) en alimentation humaine (**Kristinsson et Rasco, 2000**). La digestibilité des protéines de poisson hydrolysées présente un avantage pour la nutrition de personnes dont le système digestif est en dysfonctionnement (**Dumay, 2006**).

Quelques applications ont été trouvées pour l'utilisation des hydrolysats de poisson en tant que substitut du lait pour les bovins et les ovins (**Ørskov et al., 1982; Ritchie et Mackie, 1982**). Mais ils sont largement utilisés en nutrition animale particulièrement en aquaculture où ils se substituent partiellement à la farine de poisson (**Lian et al., 2005., Kotzamanis et al., 2007**).

▪ Support de milieu de culture microbienne

Dans la culture d'organismes microbiologiques (bactéries, champignons, levures), la source de nutriments représente le plus gros investissement (**Martone et al., 2005**). Des études ont montré que des lysats de poissons peuvent constituer de très bonnes bases de milieu de culture pour micro-organismes (**Le Bihan, 2006**). L'utilisation d'hydrolysats de poisson comme source de nutriments pour les microorganismes constitue donc une voie intéressante de valorisation. Cette utilisation permet conjointement d'augmenter la valeur des hydrolysats et de réduire le coût de production de la culture cellulaire et de diminuer l'effet négatif sur l'environnement (**Guérard et al., 2001, Aspino et al., 2005**).

2. Généralités sur les bactéries lactiques

2.1 Définition

Les bactéries lactiques (BL) sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**De Roissart, 1986**). Elles constituent un groupe taxonomiquement hétérogène. Ces organismes sont caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique sous les deux formes lévogyre et dexogyre. Cette fermentation peut être homolactique (70 à 90 % d'acide lactique) ou hétérolactique (50 % d'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂) (**Leveau et Bouix, 1993**).

2.2 Habitat

Les BL occupent des niches écologiques extrêmement variées (**Novel, 1993**). Elles sont très fréquentes dans la nature. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (**Desmazeaud, 1983**), du poisson, des muqueuses humaines et animales et du tractus digestif (**Drouault et Corthier, 2001**). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (**De Roissart, 1986**).

2.3 Caractéristiques générales

Les BL sont des cocci ou des bâtonnets, elles sont en général aérotolérantes (**Larpent, 1989**). Elles sont Gram-positif ; généralement immobiles et asporulées, ne possédant ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (**Dellaglio et al., 1994**). Elles poussent dans des conditions d'anaérobies mais peuvent être aérotolérantes (**Monnet et al., 2008**).

2.4 Classification

Les bactéries lactiques forment un groupe complexe et hétérogène, qui a subi de nombreux remaniements au cours de son existence, depuis les premières observations d'Orla-Jensen dans les années 1920, jusqu'aux méthodes moléculaires d'aujourd'hui (**Matamoros, 2008**).

les BL sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* (**Bergey's, 2009**).

Les BL regroupent environ 20 genres (**Pot et al., 2008**) répartis sur six familles (**Bergey's, 2009**) dont les principaux sont : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*,

Lactococcus, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.

❖ Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le principal genre de la famille des *Lactobacillaceae* (Guiraud et Galzy, 1985). Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du G+C% (32-53%) (Schleifer et Stachebrandt, 1983 ; Pilet M-F et al., 2005).

Les lactobacilles sont en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés, Ils ne possèdent de catalase mais parfois une pseudo-catalase est détectée.

Le genre de *Lactobacillus* est le groupe le plus large des bactéries lactiques, comprenant à présent plus de 120 espèces et 20 sub espèces ; cependant son nombre augmente chaque année (13 nouvelles espèces ont été proposés en 2005, 9 en 2006 et 7 en 2007) (Yuan Kun et Seppo, 2008).

Les lactobacilles sont groupés dans la subdivision des bactéries Gram positif à GC% inférieur à 50%, et classés dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales* et la famille de *Lactobacillaceae* (Bergey's, 2009).

• Subdivision du genre *Lactobacillus* :

Selon Kandler et Weiss (1986), ce genre est subdivisé en trois groupes selon le type de fermentaire :

Groupe I «Thermobacterium» : il comprend les espèces homofermentaires stricts, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est thermophile et se développe à 45°C mais pas à 15°C (Carr et al., 2002).

Groupe II « Streptobactérium » : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Ce groupe est mésophiles et se développent à 15° (Carr et al., 2002).

Groupe III « Betabactérium » : il est constitué des espèces hétérofermentaires stricts, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses (Carr et al., 2002).

2.5 Exigence nutritionnelles

Les BL sont des micro-organismes avec une capacité de biosynthèse très faible, ce qui explique leurs exigences nutritionnelles complexes en acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras, glucides fermentescibles et bases puriques et pyrimidiques (Axelsson, 2004 ; Wessels *et al.*, 2004 ; Atlan *et al.*, 2008).

2.5.1 Exigence en sources azotées

Les BL sont en principe incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (Luquet, 1986). Parmi ces bactéries, les lactobacilles et les leuconostocs sont les plus exigeants (De Roissart, 1986). Par exemple les *lactobacilles* ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (Lenoir *et al.*, 1992).

2.5.2 Exigences en vitamines

Les BL sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable de coenzymes dans le métabolisme cellulaire, plus particulièrement les vitamines du groupe B (les lactocoques exigent, en particulier l'acide nicotinique (B3), l'acide pantothénique (B5) et la biotine (B8), les lactobacilles ont un besoin absolu en pantothénate de calcium (B5) et en niacine (B3) (Desmazeaud, 1983).

2.5.3 Exigences en minéraux

La nécessité des minéraux métalliques dans le métabolisme chez les BL s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes. Le tableau 01 montre l'importance de certains minéraux dans le métabolisme des lactocoques.

Tableau 01 : Importance des minéraux dans le métabolisme des Lactocoques (Leveau et Bouix, 1993).

Minéral	Importance
Le magnésium (Mg ⁺⁺)	Améliore l'activité des protéases par son rôle dans la paroi cellulaire
Le potassium (K ⁺)	La régulation du pH intracellulaire
Le cuivre (Cu ⁺⁺)	Augmente la production de diacétyle

2.6 Rôles des bactéries lactiques

Les BL bénéficient d'un statut GRAS (Generally Reconized As Safe) et jouent un rôle très important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique (Stiles et Halzapfel, 1997 ; Leroy et de Vuyst, 2004 ; Pot, 2008).

Les BL interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires : saumurage des légumes, boulangerie, fabrication du vin, saurissage des poissons, des viandes et des salaisons, etc. Les principaux rôles des BL sont :

- **Domaine alimentaire**
 - Le pouvoir acidifiant
 - L'activité protéolytique
 - Les propriétés aromatiques
 - Texturation par la libération d'exopolysaccharides (EPS)
 - La production de bactériocines
- **Domaine thérapeutique**

Beaucoup d'effets bénéfiques sont attribuées aux bactéries lactiques, en ce qui concerne la santé humaine, telle que les effets sur l'écologie microbienne de l'intestin, sur la digestion de lactose, et l'absorption minérale, sur le métabolisme du cholestérol, sur l'immunocompétence, sur les propriétés antitumorales et antimutagenic. (YAO *et al.*, 2009).

❖ L'effet des probiotiques

Selon la FAO et l'OMS (2001), « *les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* ». Cette dernière définition comprend les hôtes tant humains qu'animaux (YAO *et al.*, 2009).

Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (Gbassi *et al.*, 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010).

Chez les animaux d'élevages, les probiotiques exercent un effet bénéfique sur la santé. En fonction de(s) souche(s) sélectionnée(s) et des espèces animales sur lesquelles ils sont étudiés, les effets sont différents et sur diverses pathologies. (wikipédia). Ils 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 (**Larpen, 1997**).

Chez l'homme, ces bactéries jouent un rôle inhibiteur contre les bactéries pathogènes et améliorent la digestion (**Larpen, 1997**).

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé humaine ont été associés à la consommation des probiotiques. Le tableau 02 illustre la diversité de ces effets.

Tableau 02 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (**Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008**).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants : - Mauvaise digestion du lactose - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques - Syndrome du côlon irritable - Constipation - Infection par <i>Helicobacter pylori</i> - Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin -Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né	- Modulation immunitaire - Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, Shigella</i>)	Réduction du risque de : - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) - Coronaropathie - Maladie des voies urinaires - Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes -Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

3. Les milieux de culture des bactéries lactiques

La microbiologie dépend en grande partie de la croissance et du maintien des micro-organismes en laboratoire. Ceci n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont disponibles (**Prescott *et al.*, 2010**). Le milieu de culture constitue le principal coût de production en ce qui concerne les industries de production microbienne en masse (**Coello *et al.*, 2000; Dufossé *et al.*, 2001**)

3.1 Définition d'un milieu de culture

Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisée pour faire croître, transporter ou conserver des micro-organismes (**Prescott *et al.*, 2010**).

3.2 Composition d'un milieu de culture

Un bon milieu de culture doit répondre aux exigences nutritives des bactéries en fournissant une ou plusieurs sources de matières azotées, une source de carbone, des vitamines, minéraux et pour certaines bactéries des acides gras et acides organiques spécifiques (**Desmazeaud, 1983**).

La composition précise d'un bon milieu de culture dépend de l'espèce à cultiver. La connaissance de l'habitat normal d'un microorganisme est souvent utile dans la sélection d'un milieu de culture approprié (**Prescott, 2010**).

La source azotée est généralement le composant le plus coûteux des milieux bactériens (**Le Bihan, 2006**).

La supplémentation des milieux avec des peptones ou extraits de levure permet d'apporter une source additionnelle de peptides et d'acides aminés (**Lejard *et al.*, 1994**).

Les milieux, qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée, sont appelés milieux complexes. Ces ingrédients correspondent aux peptones, extraits de viande, de levures, ils sont très utiles surtout pour les bactéries exigeantes qui ont des besoins nutritifs complexes comme les bactéries lactiques (**Prescott, 2010**).

Le tableau 03 présente les différentes composantes typiquement retrouvées dans les milieux de cultures utilisés pour la propagation des ferments lactiques.

Tableau 03 : Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production de ferments lactiques (Béal *et al.*, 2008).

Rôles des composants	Ingrédients
Source de carbone	Monosaccharides
	Disaccharides
	Lactosérum
	Lait écrémé
Source d'azote	Concentrés protéiques de lactosérum
	Hydrolysats protéique de lactosérum
	Hydrolysats de caséine
	Extraits de levures
	Peptones de levures
	Peptones d'origine animale ou végétale (soja)
Vitamines et facteurs de croissance	Acide ascorbique
	Tween
	Vitamines du groupe B
Minéraux	Sels de Ca, Mg, Mn, Fer
Sels à pouvoir tampon	Sels de K, Na, NH ₄
Antimousses	Tween
	Monoglycérides acétyles
	Antimousses avec ou sans silicone

3.2.1 Les extraits de levures

Les bactéries lactiques ayant des exigences nutritionnelles complexes élevées (Desmazeaud et De Roissart, 1994). Il faut suppléer correctement leurs milieux de culture afin de s'assurer d'une bonne production de biomasse. Les extraits de levure jouent ce rôle.

Ce sont des extraits de levures de bière (Prescott, 2010), obtenus par autolyse, constituent en fait la fraction soluble de l'autolysat de levure que l'on récupère et que l'on concentre (Anon., 1973). Les extraits de levures sont employés en tant qu'agent biostimulant pour la croissance de la plupart des microorganismes. Ils sont une excellente source d'azote, de vitamines et de minéraux (Peppler, 1982). Ils sont normalement constitués d'acides aminés, de peptides de tailles variées, de nucléosides de vitamines et de minéraux, en proportions variées (Kollar *et al.*, 1992; Peppler, 1982; Kelly, 1973).

3.2.2 Les extraits de foie

Ils sont préparés par broyage et dessiccation des foies frais. Ils sont composés de 10-12% d'azote totale, au minimum 4% azote sous forme aminée, au maximum 6% cendre sulfuriques, sont pH est de 4,5-5,5 (**Manuel de microbiologie Merck**).

3.2.3 Le Tween 80

Le Tween 80 (forme commerciale de l'acide oléique), un agent tensio-actif non ionique, est largement utilisé comme additif dans les aliments, préparations pharmaceutiques, et comme émulsifiant, un dispersant, ou stabilisant (**Budavavi et al., 1996**).

Le Tween 80 influence les propriétés de la membrane de l'organisme. Il peut dissoudre la structure de lipide dans la membrane cellulaire, ce qui améliore la perméabilité de la membrane et l'amélioration de la libération de l'enzyme intracellulaire (**Ben-Kun et al., 2009**).

3.3 Milieux de culture pour les bactéries lactiques

3.3.1 Milieux industriels pour la production de bactéries lactiques

Les BL ont de nombreuses exigences nutritionnelles, c'est la raison pour laquelle on utilise généralement des milieux riches (**Monnet et al., 2008**).

Le lait, le lactosérum sont les 2 substrats utilisés pour la culture des bactéries lactiques (**Champagne, 1998**).

3.3.1.1 Le lait

➤ Définition

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (**Pougheon et Goursaud, 2001**).

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, il constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes (**Chye et al., 2004**). C'est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition (tableau 04) et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races (**Rahali et Ménard, 1991 ; Soryal et al., 2004**).

Tableau 04 : principaux composants du lait de vache (Alais, 1984).

Composants	Concentrations (g/l)
Eau	905
Glucides (lactose)	49
Lipides :	35
dont matières grasses	34
dont lécithine (phospholipides)	0,5
dont partie insaponifiable (stérols, carotène, tocophérols)	0,5
Protides :	34
dont caséine	27
dont protéines solubles (globulines, albumines)	5,5
dont substances azotées non protéiques	1,5
Sels :	9
dont acide citrique	2
dont acide phosphorique	2,6
dont chlorure de sodium	1,7
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	traces

Le lait contient tous les éléments essentiels à la croissance des bactéries, mais pas toujours en quantité suffisante, notamment pour la fraction azotée non protéique ; sa composition n'est pas optimale pour la croissance des bactéries lactiques qui sont nutritionnellement exigeantes (Desmazeaud, 1994). Il présente d'autres inconvénients (Béal *et al.*, 2008).

- Absence de protection phagique,
- Présence éventuelle d'antibiotiques ou antiseptiques.
- Prix coûteux.

3.1.1.2 Le lactosérum

a. Définition et caractéristiques

Le lactosérum est un coproduit de l'industrie fromagère, d'un coût raisonnable (Béal *et al.*, 2008). C'est un liquide surnageant jaune verdâtre, son pH est compris entre 5 et 6,5 (Kosikowski, 1979 ; Mereo, 1980).

En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie (Amrane, 2000). Il peut être utilisé pour compléter certains milieux (Bury *et al.*, 1999; Barette *et al.*, 2000). Toutefois, la fraction azotée assimilable reste faible et il est parfois nécessaire d'effectuer une hydrolyse par des protéase afin de faciliter leur utilisation par les bactéries (Chavarri *et al.*, 1988).

Selon Poget-Ramseier (1993), le lactosérum est un bon milieu de culture pour la production d'acide lactique à l'aide des bactéries lactiques.

Le principal inconvénient lors de l'utilisation de lactosérum, est lié à la présence des protéines sériques qui précipitent lors du traitement thermique, nécessite ainsi une étape de séparation (Béal *et al.*, 2008).

b. Composition

La composition du lactosérum (tableau 05) varie considérablement selon la source du lait, les différents traitements que l'on fait subir pour le transformer en produits consommables et les procédés de fabrication (Laplanche, 2004).

Le lactosérum contient principalement du lactose et des protéines sériques, mais aussi du calcium et des vitamines (Béal *et al.*, 2008).

Il existe 2 types de lactosérum (Béal *et al.*, 2008) :

- Lactosérum doux issu d'une transformation fromagère à base de présure, pH environ de 6,5 à 7,5.
- Lactosérum acide provenant d'une coagulation acide du lait, pH environ de 4,5 à 5.

Tableau 05 : composition chimique du lactosérum (Sottier, 1990).

	Lactosérum doux (Emmental)	Lactosérum acide (Caséine)
Liquide %	93,5	94
Extrait sec %	6,5	6
pH	6,7	4,6
Compositions en g/l		
Lactose	76	74
Protéines	13,5	12
Cendres	8	12
Acide lactique	1,8	1,8
Matière grasse	1	0,5
Matières minérales		
Ca %	0,6	1,8
P %	0,6	1,5
NaCl	2,5	7,5

3.3.2 Les milieux de laboratoire

Il existe de nombreux milieux (tableau 06) pour la culture et l'isolement des bactéries. Mais, les milieux MRS et M17 demeurent les milieux de choix pour certaines souches de bactéries lactiques (Teuber, 1994).

3.3.2.1 Milieu MRS

Ce milieu est décrit par Man, Rogosa et Sharpe (1960), C'est le milieu de culture et d'isolement de base le plus connu. Ce milieu est fréquemment employé sous forme gélosé pour l'isolement sélectif des lactobacilles.

Les *Streptococcus* (dont *Lactococcus*) poussent sur ce milieu mais plus lentement que les autres souches des bactéries lactiques (Leveau, 1986). Il peut être additionné de TTC (1mg/l). Son pH est habituellement ajusté à 6,2 ou 6,5 (Carr et al., 2002). Sa composition figure dans l'annexe.

3.3.2.2 Milieu M17

Mis au point par Terzaghi et Sandine (1975) ce milieu est le plus utilisé pour le dénombrement de *Streptococcus thermophilus* et des lactocoques.

La gélose M 17 a été recommandée par la Fédération Internationale Laitière pour la numération sélective de *Streptococcus thermophilus* dans les yaourts.

Le milieu M 17 à l'acide nalidixique est utilisé pour le dénombrement des *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* var *diacetylactis* mais l'incubation se fait à 25° C (Larpen, 1997).

Tableau 06 : Milieux gélosés permettant le dénombrement de bactéries lactiques (Monnet et al., 2008).

Milieux	Utilisation
Elliker (Elliker et al., 1956)	Dénombrement des bactéries lactiques
MRS (de Man et al., 1960)	Dénombrement des bactéries lactiques
NL (Nickels et Leeselement, 1964)	Différentiation des lactocoques et leuconostocs capables d'utilisation le citrate
M16-BCP (Thomas, 1973)	Différentiation des sous-espèces <i>lactis</i> et <i>cremoris</i> de <i>Lactococcus lactis</i>
M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)	Dénombrement de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactococcus lactis</i>
KMK (Kemler et Mckay, 1980)	Différentiation des lactocoques et leuconostocs capables d'utilisation le citrate
FSDA (Huggins et Sandine, 1984)	Différentiation des lactocoques protéase + et protéase -

2.1 Cadre d'étude

Cette étude s'est déroulée du 28/06/2014 au 16/07/ 2014 au niveau de laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL.

2.2 Appareillage utilisé (voir annexe)

2.3 Matériel biologique

2.3.1 Les coproduits de poissons

3 échantillons de coproduits de poissons ont été fournis par les restaurants de citées universitaires. Ces coproduits sont un mélange (viscères et têtes) de sardine et de bogue.

Le poids total de l'ensemble des échantillons est de 2900g dont 2100g de têtes et 800g de viscères.



2.3.2 La souche de lactobacille

La souche de bactéries lactiques est *Lactobacillus brevis* isolée à partir d'un échantillon de lait de chamelle par l'équipe du Laboratoire de Biologie de Micro-organismes et de Biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran Es-Sénia.

➤ **Vérification de la pureté de la souche**

La pureté de la souche a été vérifiée par observation microscopique (X100) après coloration de Gram.

➤ **Principe :**

Elle se déroule comme suivant :

- Un frottis fixé à la chaleur est recouvert de violet de gentiane pendant 1 min à 2 min.
- Ensuite rincé rapidement à l'eau courante.
- Puis il est traité pendant 1 min par une solution de lugol.
- De nouveau on rince rapidement à l'eau.
- Ensuite, le frottis est soumis à l'action de l'éthanol 95%. La lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2

à 3 secondes. L'éthanol permet la décoloration de certaines bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif restent violettes.

- Celui-ci est rincé immédiatement à l'eau courante.
- On soumet ensuite le frottis à la fuchine pendant 30 seconde.
- Après on rince à l'eau.
- Puis on sèche le frottis.
- On termine par l'observation microscopique à l'immersion ($G \times 100$)

Au terme de ce processus, les bactéries à Gram négatif apparaissent rose et les bactéries à Gram positif violettes.

Après la vérification du Gram et la purté de la souche le lactobacille est conservé au réfrigérateur sur la gélose MRS inclinée.

2.4 Préparation des milieux de culture

2.4.1 Obtention d'hydrolysats des coproduits

L'étude a porté sur 3 échantillons de coproduits (Tableau 07). Nous avons commencé par trier séparément les têtes et les viscères de chaque échantillon. Les coproduits triés ont été additionnés d'eau distillée à raison de 2 fois leurs poids. Ensuite, ils sont portés à l'ébullition pendant 30 min en vue de les stabiliser. Après refroidissement le mélange est broyé pendant 2 min à l'aide d'un robot mixeur (WARING Commercial®).

Le broyat obtenu est préfiltré sur tissu à fin d'éliminer les grosses particules. Ensuite, le pH de préfiltrat est ajusté à une valeur de 5 (pH qui correspond à l'activité optimale de la papaïne) par addition d'acide acétique.

Pour l'hydrolyse des coproduits nous avons utilisé la papaïne qu'est une enzyme végétale issue de la papaye et classée parmi les hydrolases de la classe des cystéines endopeptidases. Son principal numéro EC est 3.4.22.2. Les conditions optimales de travail de cette enzyme sont une température allant de 40 à 80 °C et un pH compris entre 5 et 8 (Dumay, 2006). Il est additionné à raison de 100 mg/100ml de préfiltrat. Pour l'activation de cet enzyme le mélange est mis à un chauffage d'une heure à 70 °C.

Après refroidissement, le mélange est filtré sur un tissu. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une solution limpide de couleur jaunâtre et de pH compris entre 6,5 et 6,8.

Nous avons passé le filtrat sur un dispositif de filtration sous vide en utilisant un filtre de 0.45 μm . Cette opération assure à la fois la filtration microbiologique et l'élimination des fines particules. Le filtrat obtenu est réajusté à pH 6,4 par le Na-OH, puis stérilisé à 120°C pendant 20 mn.

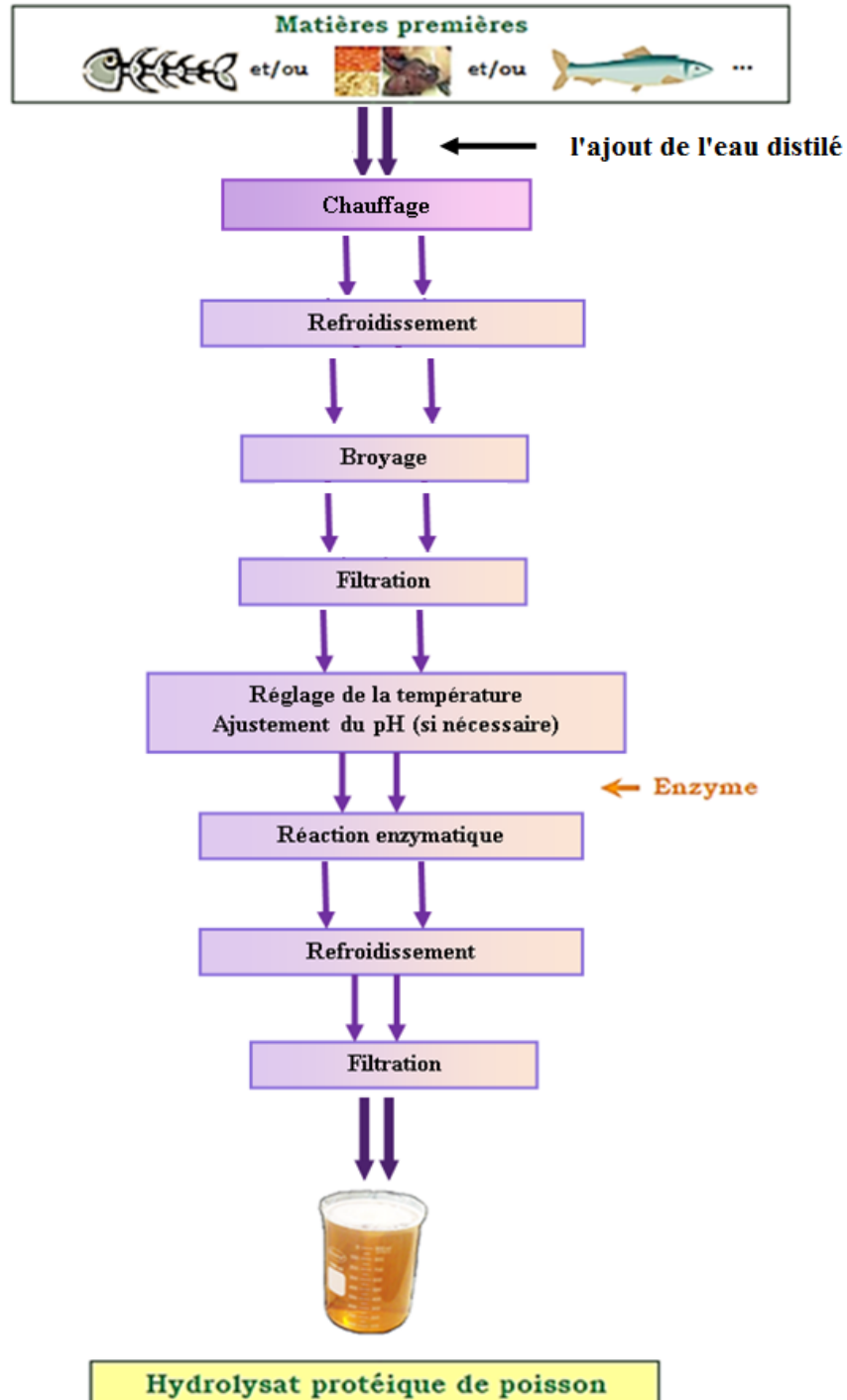


Figure 05 : Procédé d'obtention des hydrolysats.

Tableau 07 : Poids des échantillons des coproduits et volumes d'eau distillée ajoutée et volumes de filtrats obtenus.

Echantillons	Têtes			Viscères		
	1 ^{ier}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	1 ^{ier}	2 ^{ème}	3 ^{ème}
Poids (g)	500	800	800	350	250	250
L'eau additionnée (ml)	1000	1600	1600	700	500	500
Filtrat obtenu (ml)	340	471	590	/	250	250

2.4.2 Formulation des milieux de culture

Les hérétylysats des têtes ou des viscères, constituent les milieux de base. Ils sont enrichis avec différents ingrédients (Tab 08) qui selon le cas sont des sources de carbone, de matières azotées et de facteurs de croissance.

Tableau 08 : Rôles et concentrations des différents composés des milieux.

	Rôles	Concentration
Lactosérum	Utilisé le lactose comme source de carbone et d'azote	20g/l
Extrait de levure	Source d'acide aminés et surtout de vitamines hydrosolubles	5g/l
Extrait de foie	Source d'acide aminés et surtout de vitamines hydrosolubles	5g/l
Tween80	Stimulation de la croissance	1ml/l

➤ Les différentes combinaisons préparées

- L1 : milieu de base, lactosérum et extrait de foie.
- L2 : milieu de base, lactosérum et extrait de levure.
- L3 : milieu de base, lactosérum, extrait de foie et tween80.
- L4 : milieu de base, lactosérum, extrait de levure et tween80.
- L5 : milieu de base, lactosérum, extrait de foie et extrait de levure.
- L6 : milieu de base, lactosérum, extrait de foie, extrait de levure et tween80.

Concernant les filtrats de viscères, nous avons reproduit les mêmes milieux de culture, il y en a cependant qu'un seul qui a été retenu :

- V3 contient le filtrat de viscères, lactosérum, extrait de foie et tween80.

Ces différents milieux sont additionnés d'agar (13g/l) puis mis dans des flacons et stérilisés à 120°C pendant 20mn.

2.4.3 Evaluation du potentiel des milieux de culture formulés.

➤ Milieu témoin

Nous avons utilisé le milieu MRS comme témoin (composition voir annexe). Il a été préparé en solubilisant 52g de poudre commerciale dans un litre d'eau distillé. Après homogénéisation, le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 min. Le MRS gélosé est obtenu de la même façon en additionnant 15g/l d'agar avant la stérilisation.

2.4.3.1 Préparation de pré-culture

A partir de la culture sur la gélose MRS inclinée, on a prélevé une colonie qui a été transférée dans un tube contenant 10 ml de milieu MRS liquide. Puis la culture est mise en incubation dans l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

2.4.3.2 Mise en culture de la souche

Afin de comparer le potentiel des différents milieux formulés nous avons cultivé *Lactobacillus brevis* sur le milieu MRS liquide. Après 18 h d'incubation à 37°C.

La culture sert à la préparation d'un inoculum de densité optique comprise entre 0,5-0,6.

La mesure de la densité optique (DO) est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible (Meyer *et al.*, 2010). Elle ne donne des résultats précis que lorsque les valeurs mesurées sont supérieures à 0,01 unité, ce qui ne permet pas, en générale, de quantifier des populations inférieures à 10^6 - 10^7 ufc/ml. Lorsque l'absorbance de la culture est supérieure à 0,6 unité, il faut diluer celle-ci avec du milieu non ensemencé pour éviter une saturation du spectrophotomètre (Corrieu, 2008).

2.4.3.3 Préparation des dilutions

A partir de la culture de densité optique 0,5-0,6 des dilutions décimales (10^{-1} 10^{-7}) ont été préparées. Le diluant utilisé est de l'eau physiologique.

2.4.3.4 Ensemencement

0,1 ml de chacune des dilutions (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) estensemencé à la surface de chaque milieu. Tous les ensemencements sont effectués en double. Les cultures sont mises en incubation à 37°C pendant 24 à 48 h.

2.4.3.5 Dénombrement

Le potentiel des différents milieux formulés est évalué visuellement (vitesse d'apparition, couleur, forme et nombre des colonies). Les résultats sont exploités de la manière suivante :

On retient les boîtes contenant de 25 à 300 colonies ;

On calcule le nombre de bactéries N par ml à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

- \sum colonies : sommes des colonies des boîtes interprétables ;
- V_{mL} : volume de solution déposé (0,1 ml) ;
- n_1 : nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ;
- n_2 : nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ;
- d_1 : facteur de la première dilution retenue.

Le résultat est ensuite exprimé en nombre d'unités formant colonies (ufc) par unité de volumeensemencé. Il s'agit de la méthode de référence pour la quantification de la croissance des bactéries lactiques. Elle représente un seuil de sensibilité très bas (en théorie, il suffit de pouvoirensemencer l'équivalent de 30 ufc par boîte de Pétri) et, surtout, elle donne une bonne indication du nombre de cellules viables. Cependant, les résultats ne sont obtenus qu'assez tardivement puisque la formation de colonies nécessite une incubation d'une durée de 24 à 48 h à la température optimale de croissance (**Monnet et al., 2008**).

3.1 Résultats

3.1.1 Description des milieux de culture

Les milieux de culture formulés sont visqueux de couleur brunâtre. L'ajout de l'agar donne des milieux comparables au milieu témoin (MRS). Cependant les milieux gélosés à base d'hydrolysats de viscère présentent un aspect mou.

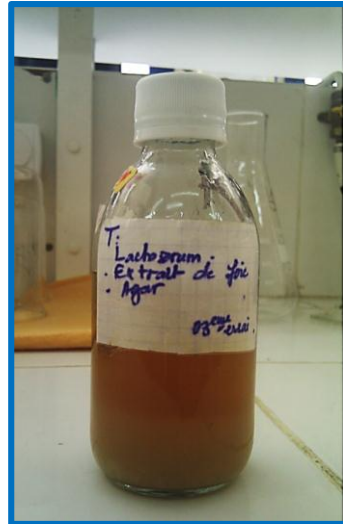


Figure 07 : Aspect d'un milieu de culture formulé.

3.1.2 Evaluation du potentiel des milieux de culture mis au point

3.1.2.1 Aspect microscopique de la culture

Afin de vérifier la pureté de la souche nous l'avons repiqué plusieurs fois puis observé microscopiquement après coloration de Gram : les cellules sont en forme des bacilles disposées en paires ou en chaînettes (Figure 06).

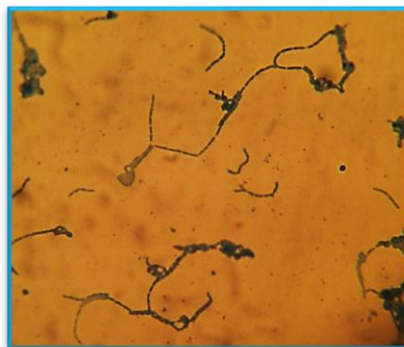


Figure 06 : Observation microscopique de *Lb. brevis* après coloration de Gram (X 100).

3.1.2.2 Aspect macroscopique des cultures

Après 24 à 48 h d'incubation l'observation des cultures permet de décrire les colonies. Ces dernières sont de couleurs blanche et crème, de formes rondes, bombées et de tailles variables.

3.1.2.3 Dénombrement

Tous les milieux mis au point ont permis une bonne croissance de la souche testée (*Lactobacillus brevis*).

Les résultats du dénombrement de *Lactobacillus brevis* sur les différents milieux formulés et témoin sont résumés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Résultats du dénombrement de *Lb. brevis* sur les différents milieux.

Milieux	L1	L2	L3	L4	L5	L6	V3	MRS
UFC/ml.10 ⁸	1,8	1,1	9,7	4,5	3,6	1,6	9,9	5,05

D'une manière générale, les résultats obtenus montrent que la densité bactérienne sur les différents milieux varie entre $1,1 \cdot 10^8$ et $9,9 \cdot 10^8$ ufc/ml. La souche se développe de manière plus importante sur les milieux L3 et V3 que sur le milieu témoin (MRS). Sur ce dernier la croissance du lactobacille est seulement de $5,05 \cdot 10^8$ ufc/ml et ceci malgré sa riche et complexe composition.

La comparaison du développement bactérien sur tous les milieux permet de faire les observations suivantes :

Le milieu L1 contient l'hétérolysate des têtes, le lactosérum et l'extrait de foie. Il donne une bonne croissance avec une densité bactérienne de $1,8 \cdot 10^8$ ufc/ml. Alors que le milieu L2 est composé du même hétérolysate, de lactosérum et de l'extrait de levure permet une croissance légèrement plus faible $1,1 \cdot 10^8$ ufc/ml.

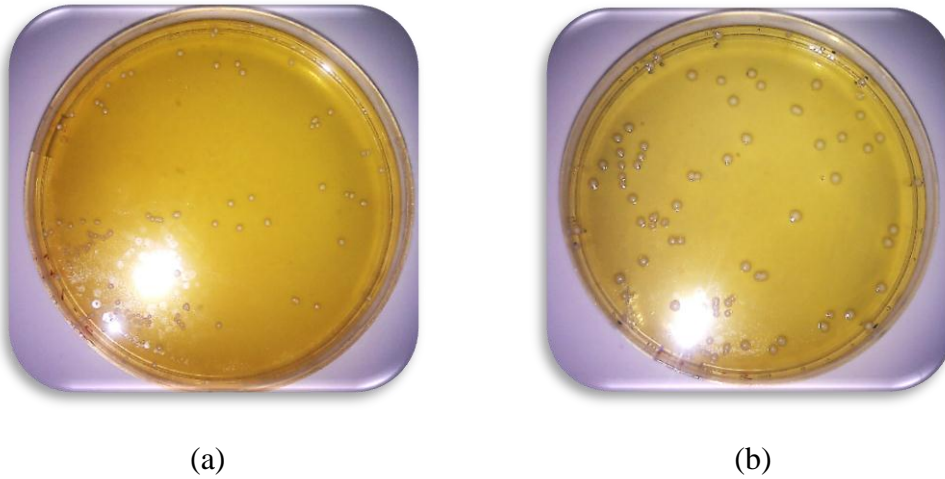


Figure 09 : Résultats de la culture de *Lb. brevis* sur les milieux L1 (a) et L2 (b).

La densité bactérienne sur le milieu L3 est de $9,7.10^8$ ufc/ml est nettement supérieure à celle du milieu témoin ($5,05.10^8$ ufc/ml).

Ce milieu L3 est constitué de l'hétérolysate des têtes, de l'extrait de foie, du lactosérum, du Tween 80. L'association de ces composants améliore sensiblement la croissance de la souche testée.

Le milieu L4 permet une croissance de $4,5.10^8$ ufc/ml très proche de celle obtenue sur le MRS milieu ($5,05.10^8$ ufc/ml). Dans ce milieu l'extrait de foie est remplacé par l'extrait de levure.

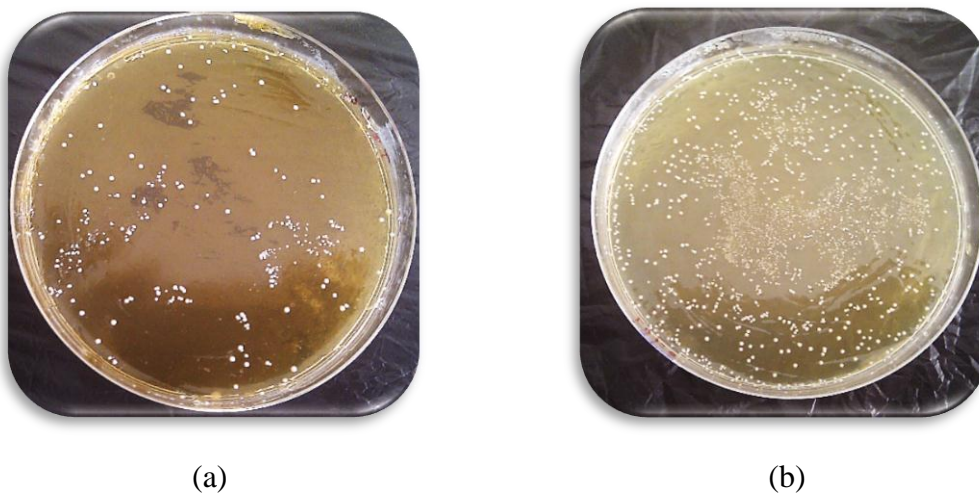


Figure 10 : Résultat de culture de *Lb. brevis* sur les milieux L3 (a) et L4 (b).

La comparaison des milieux L1, L2, L3 et L4 fait ressortir que l'extrait du foie est le meilleur biostimulant que l'extrait de levure.

L'ajout du Tween 80 dans les milieux L3 et L4 améliore sensiblement la croissance de *Lb. brevis*. Il est à noter que dans ces milieux l'extrait de foie demeure le meilleur biostimulant.

Le milieu L5 est une combinaison de l'hétérolysate des têtes, de lactosérum, des extraits de foie et de levure. Cette combinaison a donné une bonne croissance avec une densité microbienne de $3,6.10^8$ ufc/ml mais reste inférieure à celle observée sur le MRS.

Le milieu L6 contient tous les éléments testés (l'hétérolysate, le lactosérum, l'extrait de foie, l'extrait de levure et le tween 80). Ce milieu bien qu'il est plus riche que les autres milieux donne une faible densité microbienne de $1,6.10^8$ ufc/ml en comparaison aux autres densités données par les milieux formulés.

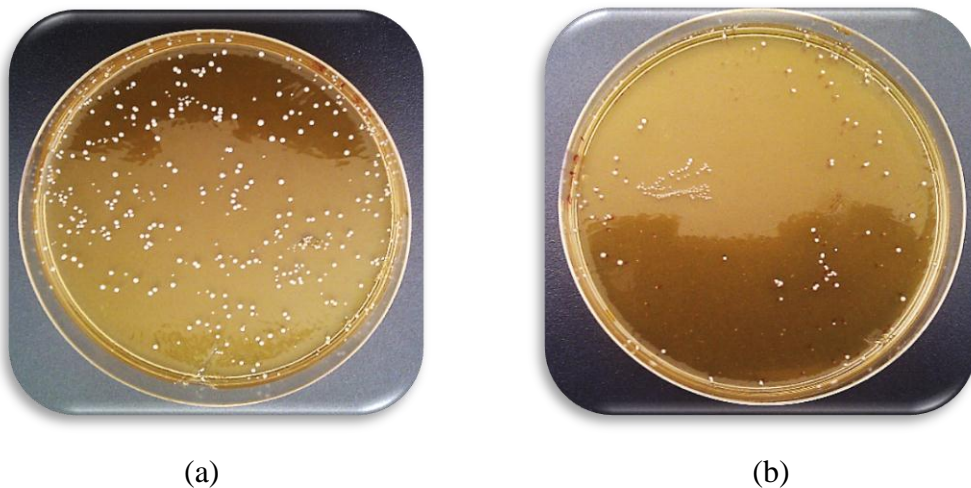


Figure 11 : Résultat de la culture de *Lb. brevis* sur le milieu L5 (a) et L6 (b).

Le milieu V3 est la seule combinaison à base de viscères ayant donné un milieu de culture convenable. Toutes les autres combinaisons ont été formulées mais les milieux de culture obtenus présentaient un aspect trop mou malgré les fortes quantités d'agar ajoutées.

Ce milieu contient en plus le lactosérum, l'extrait de foie et le Tween 80. Cette combinaison a donné la meilleure croissance avec une densité microbienne de $9,9.10^8$ ufc/ml.



Figure 12 : Résultat de culture de *Lb. brevis* sur le milieu V3.

3.2 Discussion

D'une manière générale tous les milieux mis au point ont permis une bonne croissance de la souche testée puisque la densité cellulaire moyenne est de $4,5 \cdot 10^8$ ufc/ml. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'apport des différents nutriments (hétérolysats, lactosérum, extrait de foie, extrait de levure et Tween 80).

En effet, les hétérolysats sont riches en éléments nutritifs (facteurs de croissance pour la souche testée). Nos résultats concordent avec ceux de **Dufossé *et al.*, (2001)** qui ont montré que l'utilisation de l'hydrolysats du poisson permet d'obtenir de bons résultats de croissance pour *Lactobacillus casei* en comparaison avec un milieu commercial classique.

Nos résultats sont également proche de ceux de **Martone *et al.*, (2005)** qui ont montré qu'un hydrolysats de hareng permet une culture lactique identique à celle obtenue sur un milieu de référence, à condition que la salinité et le pH de l'hydrolysats soient identiques.

Le lactosérum contient le lactose (principale source d'énergie), de la matière azotée non protéique, des vitamines et des minéraux (**Agnes, 1986**) participent au bon développement bactérien. Nos résultats se rapproche des études qui ont montré que le lactosérum constitué une base pour l'élaboration de milieux pour bactéries lactiques (**Amrane, 2000 ; Djaghri, 2007 ; Botofonja, 1994**).

L'extrait de levure est un stimulateur de croissance pour les bactéries lactiques, parce qu'il fournir aux bactéries des vitamines, de l'azote et des acides aminés qui sont des éléments importants pour la croissance bactérienne.

Un nombre important de recherches ont été publiées, démontrant clairement le pouvoir biostimulant des extraits de levure pour la croissance des bactéries lactiques. Comme le démontre **Bibal *et al.*, (1989)**, plus la quantité d'extrait de levure est importante plus la biomasse produite est élevée, jusqu'à atteindre un certain seuil de toxicité pouvant aller au-delà de 10% (**Gaudreau *et al.*, 1997**).

L'ajout du Tween 80 améliore sensiblement la croissance du *Lb. brevis*. Il sert comme un facteur de croissance essentiel. Ces résultats sont conformes à ceux de **Duggan *et al.*, 1959** et **Oh *et al.*, 1995** qui ont démontré l'effet stimulant du Tween 80 sur la croissance des lactobacilles.

Il est contenu que le Tween 80 peut dissoudre la structure de lipide dans la membrane cellulaire, ce qui améliore la perméabilité de la membrane et l'amélioration de la libération de l'enzyme intracellulaire (**Ben-Kun, 2009**).

La combinaison des (hétérolysats, lactosérum, l'extrait de foie, l'extrait de levure et le Tween 80) n'apporte pas d'amélioration ceci pourrait être expliqué par l'apport d'un excès de nutriment. Ce résultat se rapporte à celui de **Desmazeaud., (1994)** qui indique que les milieux de culture ne doivent présenter aucun facteur limitant du fait de la présence d'un élément en trop forte ou faible concentration.

Conclusion

Notre étude a porté sur la valorisation des coproduits de poisson et du lactosérum en vue de formuler des milieux de culture pour *Lb. brevis*.

Au cours de ce travail nous avons formulé 7 milieux de culture à base d'hétérolysats des têtes et des viscères.

Les résultats obtenus montrent que :

- *Lb. brevis* se développent bien sur tous les milieux (Densité moyenne : $4,6.10^8$ ufc/ml).
- Les milieux L3 et V3 sont très favorables à la souche testée, et permettent une meilleure croissance que le milieu de référence.
- L'extrait de foie est plus efficace que l'extrait de levure.
- L'ajout du Tween 80 améliore sensiblement la croissance du *Lb. brevis*.

Ces résultats sont prometteurs pour la valorisation des coproduits de poisson. Ainsi, la valeur ajoutée de ces coproduits serait importante en raison de la demande des industries de production microbienne en milieux de culture de haute valeur et de faible coût.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives :

- ❖ Concernant l'hydrolyse enzymatique, il serait intéressant d'améliorer les conditions opératoires.
- ❖ Lors de la conduite de futurs travaux, il serait intéressant d'étudier les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des hydrolysats.
- ❖ Tester le potentiel des meilleurs milieux à l'aide de plusieurs souches lactiques en culture pure et en culture mixte.

Bibliographie

AGNES, N. (1986). Production des protéines à partir de lactosérum brut. Thèse de 3eme cycle, université de Lyon.

ALAIS, C. (1984) : Science du Lait ; Principe des Techniques Laitières. SEPAIC, Paris.

AMRANE, A. (2000). Effet of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. Journal of chemical technology and biotechnology, vol 75. pp. 223-228.

ANDRIEUX, G. (2004). La filière française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture : Etat des lieux et analyse. Etude de l'OFIMER. 63 p.

ASPMO, SI. et al . (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochem, vol 40.pp.1957-66.

AXELSSON, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria and functional aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3^e Éd., Dekker: Marcel. pp.1-66.

BARETTE, J. et al . (2000). The production of mixed cultures containing strains of *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* and *Lactobacillus rhamnosus*, on commercial starter media. J Ind Microbiol Biotechnol, vol 25. pp. 288-297.

BARRETTE, J. (1998). Production d'extraits de levure biostimulant destinés à la propagation des Lactocoques. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.).156 p.

BEAL, C. et al . (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. Cord : Corrieu, G. et Luquet, FM. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. pp. 661-786.

BEN-KUN, QI. et al . (2009). Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*. Ed : Songklanakarin J. Sci. Technol, vol 31. pp. 85-89.

BERGEY. (2009). Manuel de la systématique bactérienne. Éd RE Buchanan and N.E Gibbons. 600 p.

- BIBAL, B. et al . (1989).** Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. Applied Microbiology and Biotechnology, vol 30. pp. 630-635.
- BOTOFONJA, G. (1994).** Etude de l'activité acidifiante de *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgarius* et croissance d'un ferment lactique sur lactosérum. Mémoire d'ingénieur en technologie des industries agro-alimentaire, INA, El-Harrach. 90 p.
- BUDAVAVI, S. et al . (1996).** An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.
- BURY, D. et al . (1999).** Growth of *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgarus* 11842 in whey supplemented with various whey protein concentrate. Milchwiss, vol 54. pp. 610-612.
- CARR, FJ. et al . (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Rev. Microbiol, vol 28. pp. 281-370.
- CHAMPAGNE, C P., (1998)** Préparation des ferments en usine In : Production de ferments lactiques. CRDA. Edisem. St-Hyacinthe, Québec. pp.117-151
- CHAVARRI, F. et al . (1988).** Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis*. INIA 12. J Food Sci, vol 53. pp. 1854-1857.
- CHYE, FY. et al . (2004).** Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiol, vol21. pp. 535-541.
- COELLO, N. et al . (2000).** Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage. Bioresource Technology, vol 73. pp. 221-225.
- DE MAN, JC. et al . (1960).** A medium for cultivation of Lactobacilli. Journal of applied. Bacteriology, vol 23. pp. 130-135.
- DE ROISSART, H. (1986).** Bactéries lactiques. In : Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes.
- DELLAGLIO, F. et al . (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : les bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologique. Lorica, Uriage, vol II. pp. 25-116.

- DENES, A. (2006).** Etude comparée de l'effet de deux protéases sur la production d'hydrolysats dotés d'activités antioxydants et antiradicalaire. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. 45 p.
- DESMAZEAUD, MJ. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*, vol 63. pp. 267-316.
- DESMAZEAUD, MJ. (1994).** Le lait milieu de culture In : les bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologique. *Lorica, Uriage*, vol II. pp. 25-36.
- DJEGHRI-HOCINE, B. et al . (2007 b).** Evaluation of de-lipidated egg yolk and yeast autolysate as growth supplements for lactic acid bacteria culture. *Int. J. Dairy Technol*, vol 60. pp. 292-296.
- DROUAULT, S. et al . (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, vol 32. pp. 101-117.
- DUFOSSE, L. et al . (2001).** Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on gompertz modeling of microbial growth. *Current Microbiology*, vol 42. pp. 32-38.
- DUGGAN, DE. et al . (1959).** A frozen concentration of *Lactobacillus acidophilus* for preparation of a palatable acidophilus milk. *Food Technology*, vol 13. pp. 465-469.
- DUMAY, J. (2006).** Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : Application à la valorisation de coproduits de poisson (*Sardina pilchardus*). Thèse de doctorat : Ifremer et université de Nantes. 283 p.
- FAO. (2009).** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2008. Rapport de la FAO. 216 p.
- FROST, GM. (1986).** Commercial production of enzymes. In : *Development in food production proteins*. 4^e Éd. London: Elsevier Applied Science. pp. 57-67.
- GAUDREAU, H. et al . (1997).** Lactic fermentation of media containing high concentrations of yeast extracts. *Journal of Food Science*. Publication à venir.
- GBASSI, KG. et al . (2011).** In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J*, vol 21. pp. 97-102.

- GBOGOURI, GA. (2005).** Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés oméga 3 à partir de têtes de saumon (*Salmo salar*) par hydrolyse enzymatique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de lorraine. 171 p.
- GUERARD, F. et al . (2001).** Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. J Mol Catal B-Enzym., vol 11. pp. 1051-1059.
- GUIRAUD, J. et al . (1985).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'Usine.
- HEU, MS. et al . (2003).** Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chemistry, vol 82. pp. 235-242.
- IFREMER. (2012).** Hydrolyse, hydrolysats protéiques et peptides bioactifs de produits de la mer. Fiche réalisée pour Bibliomer.
- JOHNSON, HM. (2002).** Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture. 43 p.
- KANDLER, O. et al . (1986).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 1209-1234.
- KELLY, M. (1973).** Yeast extract. In: Industrial Enzymology. T. Godfrey et J. Reichel. Éd .The Nature Press. pp. 457-465.
- KOLLAR, R. et al . (1992).** Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Food Biotechnology, vol 6. pp. 225-237.
- KOSIKOWSKI, FV. (1979).** Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum, paris, revue laitière française n°372.
- KOTZAMANIS, YP. et al . (2007).** Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative biochemistry and physiology, vol 147. pp. 205-214.

- KRISTINSSON, HG. et al . (2000).** Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol 40. pp. 43-81.
- LAPLANCHE, J. (2004).** Systhème d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric*, vol 36. pp. 220-224.
- LARPENT, JP. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Éd. Dunod .496 p.
- LARPENT, JP. (1997).** Microbiologie alimentaire. Paris: Tec et Doc, Lavoisier. pp. 10-72.
- LE BIHAN, E. (2006).** Valorisation des coproduits issus de la pêche des cephalopods : application à la seiche (*Sepia officinalis*). Thèse de doctorat de l'université de CAEN/Basse-Normandie. 317 p.
- LEJARD, F. et al . (1994).** Production de ferments concentrés pour ensemencement direct. In : les bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologique. Lorica, Uriage, vol I. pp. 539-553.
- LENOIR, J. et al . (1992).** Les groupes microbiens d'intérêt laitiers, Éd Cidil. pp. 30-50.
- LEROY, F. et al . (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends foods Sci. Technol*, vol 15. pp. 67-78.
- LEVEAU, JY. et al . (1993).** Microbiologie industrielle. Paris : Tec et Doc, Lavoisier pp. 85-87
- LIAN, PZ. et al . (2005).** Characterization of squid-processing by-product hydrolysates and its potential as aquaculture feed ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, vol 53. 5587 p.
- LUQUET, FM. (1986).** Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre), T3 ; qualité, énergie et table de composition, Ed technique et documentation, paris. 442 p.
- MANUEL DE MICROBIOLOGIE MERCK.** Laboratoire Merck-Clé VENOT.S.A. France.
- MARTONE, CB. et al . (2005).** Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technol*, vol 96. 383 p.
- MATAMOROS, S. (2008).** Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des

mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de doctorat : Discipline : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment. Spécialité : Microbiologie.

MEREO, J. (1980). Les utilisations industrielles du sérum, fromagerie. Paris : Revue française n°365. 401 p.

MEYER, A. et al . (2010). Cours de microbiologie générale avec problème et exercices corrigés. 2^e Éd. Wolters Kluwer. 430 pp.

MONNET, C. et al . (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. Cord : Corrieu, G. et Luquet, FM. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. pp. 512-612.

NGUYEN THI MY HUONG. (2009). Valorisation de matières premières marines de faible valeur ajoutée : application aux coproduits de thon. Thèse de doctorat de l'Université de Nantes. 194 p.

NOVEL, G. (1993). Les bactéries lactiques in microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industrielle, Ed : leveau J.Y., Bouix M. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. pp. 171-215.

OH, S. et al . (1995). Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. Applied Environmental Microbiology, vol 61. pp. 3809-3814.

ØRSKOV, ER. et al . (1982). Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. Anim. Feed Sci. Tech., vol 7. pp. 135-40.

PATTERSON, CA. (2008). Probiotiques : Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. AAFC. pp. 1-4.

PEPPLER, HJ. (1982). Yeast extract. In: Economic Microbiology. Fermented food vol I.

PIGOTT, GM. et al . (2003). Fish oils/Production. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition. pp. 2491-2495. Edts. B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas. Academic Press. Quaglia GB and Orban E. 1987 a. Enzymic Solubilisation of proteins of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. J. Sci. Food Agric, vol 38. pp. 263-269.

PILET, MF. et al . (2005). Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaires « compendium d'hygiène des aliments ». Federighi M. economica. pp. 219-242.

POGET-RAMSCIER, C. (1993). Production d'acide lactique et acétique en vue d'une valorisation industrielle du petit lait et de son permeat par fermentation. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de Lausanne.

POT, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. pp. 1-152.

POUGHEON, S. *et al* . (2001) Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. 566 p.

PRESCOTT, LM. *et al* . (2010). Microbiologie. Boeck, d, and Larcier (Eds). Bruxelles, Belgium. 1086 p.

RAHALI, V. *et al* . (1991). Influence des variant génétiques de la B-lactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. Lait, vol 7. pp. 275-297.

RANDRIAMAHATODY, ZO. (2011). Valorisation biotechnologique des coproduits de crevette : utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar. Thèse de doctorat d l'université d'Antananarivo. 236 p.

RAVALLEC-PLE, R. (2000). Valorisation d'hydrolysats d'origine marine : optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. 171 p.

RITCHIE, AH. *et al* . (1982). Preparation of fish protein hydrolysates. Anim. Feed Sci. Tech., vol 7. pp. 125-33.

ROKKA, S. *et al* . (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Eur. Food Res. Technol, vol 213. pp. 1-12.

ROY, P. *et al* . (1997). Les enzymes dans la fabrication d'aliments à base de produits de la mer. Dans Enzymes en agroalimentaire. Larreta-Garde Éd. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. pp. 95-120.

SALMINEN, S. *et al* . (2004). Human studies on probiotics: what is scientifically proven today in: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3^e Éd. Dekker : Marcel. pp. 515-530.

SCHIPP, G. (2008). Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable? Department of Primary Industry - Fisheries and Mines. Northern Territory Government. Technote, vol 124. 15 p.

SCHLEIFER, KH. *et al* . (1983). Molecular systematics of procaryotes. *Annus. Rev. Microbiol*, vol 37. pp. 143-187.

SORYAL, KA. *et al* . (2004). Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk domiati cheese. *Small Ruminant Res*, vol 52. pp. 109-116.

SOTTIEZ, P. (1990). Produit dérivés des fabrications fromagères. In : lait et produit laitiers ; vache, brebis, chèvre. Paris: Lavoisier. 633 p.

STILLES, ME. *et al* . (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter.J. Food Microbiol*, vol36. pp. 1-29.

TERZAGHI, BE. *et al* . (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, vol 29. pp. 807-813.

TEUBER, M. (1994). Lactic acid bacteria. *Biotechnology*, vol 1. pp. 325-364.

YAO, AA. *et al* . (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vêt*, vol 153. pp. 54-65.

Annexe 01

Composition des milieux de culture

Milieu MRS	Composition
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5g
Agar	15g
pH	5,4
Eau distillée	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Bouillon M 17	Composition
Peptone de soja.....	5g
Peptone de viande.....	2,5g
Peptone de caséine.....	2,5g
Extrait de viande.....	5g
Extrait de levure.....	2,5g
Lactose.....	5g
Acide ascorbique.....	0,5g
Glycérophosphate de sodium.....	19g
Sulfate de magnésium.....	0,25
pH.....	7,1
Eau distillé	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Annexe 02

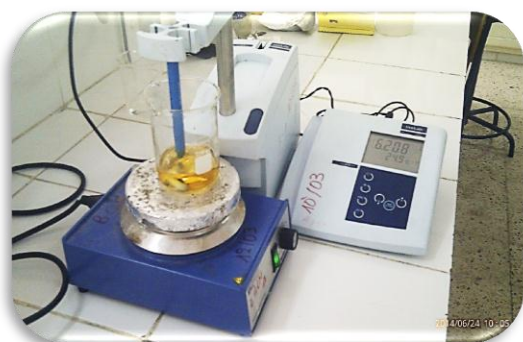
Matériels et réactifs



Agitateur magnétique



Balance de précision



pH mètre



Bain Marie



Mixeur



Dispositif de filtration



Autoclave



Microscope optique

Autre matériels

- Etuve bactériologique 37°C.
- Verreries
- Réfrigérateur.
- Spectrophotomètre.

Réactifs

Nous avons utilisé l'ensemble des produits suivants :

- **Eau physiologique stérile.**
- **Acide acétique et NaOH :** Pour l'ajustement du pH
- **L'huile à immersion :** Pour l'observation microscopique.
- **Violet de gentiane, fushine, lugol et l'éthanol :** Pour la coloration de Gram.

Annexe 03

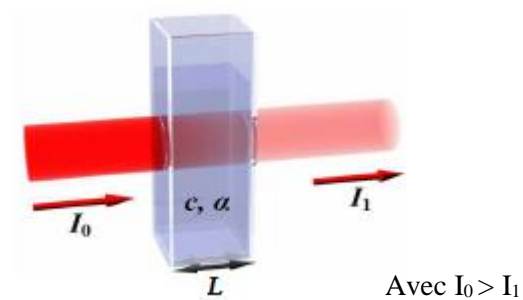


Figure 08 : Aspect de la culture (à 37°C pendant 18 h) de *Lb. brevis* sur bouillant MRS.

Annexe 04

Principe de mesure de la densité optique

Lorsqu'une suspension cellulaire dans un milieu limpide est traversée par un faisceau lumineux monochromatique, elle absorbe une quantité de lumière qui est proportionnelle à sa concentration cellulaire selon la loi de Beer Lambert ($A = D.O = \log(I_0/I) = \epsilon.L.C$).



Annexe 05

Tableau 10 : composition de l'extrait de levure (Ghaly et al ,2003)

Composition	%
- Humidité	3
- Azote total	8.8
- Protéine	55
- Solubilité (mg/l) à 30°C	3000-1000
Acides aminés	% de totale
- Alanine	3.4
- Acide aminobutyrique	0.1
- Arginine	2.1
- Asparagine	3.8
- Cystine	0.3
- Acide glutamique	7.2
- Glycine	1.6
- Histidine	0.9
- Isoleucine	2.0
- Leucine	2.9
- Lysine	3.2
- Methionine	0.5
- Orthonine	0.3
- Phenylalanine	1.6
- Praline	1.6
- Serine	1.9
- Threonine	1.9
- Tyrosine	0.8
- Valine	2.3
Sels minéraux	%
- NaCl	<1
- Cuivre	---
- Fer	---
- Magnésium	---
- Potassium	---
- Sodium	---
Vitamines	ppm
- Thiamine	20-30
- Riboflavine	50-70
- Pyridoxine	25-35
- Niacinamide	600
- Acide pantothenique	200

Annexe 06

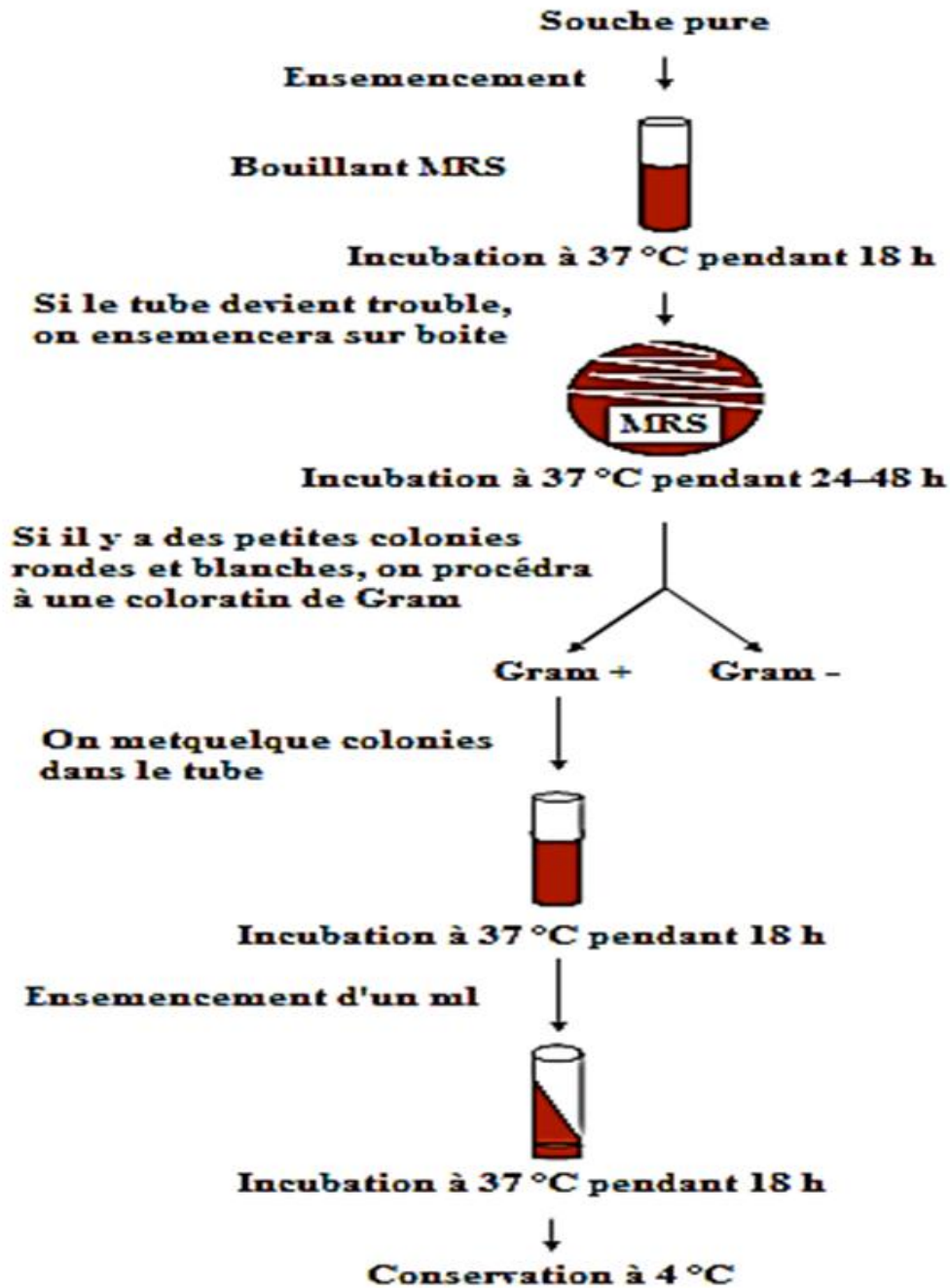


Figure 13 : préparation des tubes de conservation.

Résumé

Les coproduits de poissons représentent des ressources biologiques valorisables pouvant générer différentes molécules d'intérêts nutritionnels et biologiques. L'objectif de ce travail consiste de valoriser les coproduits de poissons et de lactosérum pour la formulation des milieux de culture pour la croissance de *Lactobacillus brevis*.

Dans ce travail nous avons utilisé les têtes et les viscères de la sardine et de la bogue. Ces coproduits ont été passé par un procédé d'hydrolysé par l'addition de l'enzyme (papaïne) afin d'obtenir une solution limpide de couleur jaunâtre. Cette dernière a été ensuite enrichie par différents ingrédients (le lactosérum, l'extrait de foie, l'extrait de levure et le Tween 80) afin de formuler 7 milieux à base d'hétérolysats de poisson.

Après nous avons utilisé une souche de bactérie lactique (*Lactobacillus brevis*) pour évaluer le potentiel des milieux formulés que nous avons comparé avec le milieu MRS.

Nous avons montré que l'utilisation des coproduits de poissons constitue un bon substrat pour la croissance de la souche testée.

Mots Clés : valorisation, coproduit de poisson, lactosérum, croissance, *Lactobacillus brevis*.

ملخص

تمثل بقايا الأسماك مصادر حيوية يكمن تطويرها إلى عدة منتجات ذات قيمة غذائية وحيوية مهمة. الهدف من هذا العمل هو تطوير بقايا الأسماك ومصل اللبن من أجل صياغة أوساط تغذية صالحة لتكاثر *Lactobacillus brevis*.

في هذا العمل قمنا باستخدام رؤوس واحشاء سمك السردين والبوقا. هذه البقايا مرت بعملية تحليل بإضافة انزيم البابيين قبل الحصول على محلول صافي ذو لون ضارب إلى الصفرة. بعد ذلك تم اغناء هذا الأخير بمواد مختلفة (مصل اللبن، مستخرج الكبد، مستخرج الخميرة والتوين 80) التي سمحت بتشكيل 7 أوساط تغذية أساس تركيبها محلول السمك

بعد تشكيل أوساط التغذية قمنا باختبار مدى فعاليتها باستعمال إحدى سلالات بكتيريات اللبن (*Lactobacillus brevis*) ومن ثم مقارنتها مع وسط التغذية MRS.

أوضحت النتائج ان استعمال بقايا الأسماك تشكل وسط جيد لتكاثر السلالة المستعملة.

كلمات المفتاح: تطوير، بقايا الأسماك، مصل الحبيبي، تكاثر، *Lactobacillus brevis*.