



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
et de l'Univers



Département de Biologie
*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au
Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)*
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطبي والبيئة

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : MICROBIOLOGIE

Thème :

**ETUDE DU POUVOIR ACIDIFIANT DES BACTERIES
LACTIQUES APPARTENANT AU GENRE
*LEUCONOSTOC***

Présenté par :

M^{elle} : *IDDER Zouleykha*

Soutenu le : 16/06/2014

Devant le jury suivant :

Président :	Dr REBIAHL S.	Maitre de conférences	U. Tlemcen
Examineur :	Dr BARKA S.	Maître de conférences	U. Tlemcen
Examinatrice :	M ^{me} BENSALAH F Z	Maitre assistante classe A	U. Tlemcen
Promotrice :	Dr BENDIMERAD N.	Maître de conférences	U. Tlemcen

Année Universitaire : 2013 - 2014

Remerciement

Avant tout, je remercie **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser ce travail dans de meilleures conditions.

A ma promotrice Madame Bendimerad N, Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen

Vous m'avez toujours accueilli avec une grande sympathie et bienveillance tout au long de ce travail, vous, vous m'avez guidé dans la méthodologie de recherche et avec votre aide précieuse et vos remarques constructives, je suis parvenue à achever ce travail.

Je vous remercie très sincèrement pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré vos nombreuses obligations. Votre disponibilité, votre écoute

Veillez trouver ici, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Rebihi S, Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen

Je suis très honorée que vous acceptiez de présider mon travail.

Trouvez ici le témoignage de ma totale gratitude.

Sincères remerciements.

A Monsieur Barka S, Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen

Je suis très honorée que vous acceptiez d'examiner mon travail.

Trouvez ici le témoignage de ma totale gratitude.

Sincères remerciements.

A mon examinatrice Madame Bensalah F.Z, Maitre Assistante à l'Université de Tlemcen

Je suis très honorée que vous acceptiez d'examiner mon travail.

Je saisi cette occasion pour vous exprimer mes sentiments de respect et de gratitude.

Veillez agréer l'expression de mes sentiments les plus distingués.

Un remerciement spécial et chaleureux à **Medjahdi Khadidja** et **Meriem Benhmed**

« Doctorantes au LAMMAB » pour leur soutien, leur compréhensions et leur encouragements.

Très nombreux sont les gens qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail.

Tout en s'excusant auprès d'eux de ne pas les citer, je leur exprime mes vives reconnaissances.

Dédicaces

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.

Je dédie ce travail à

Mon père qui aurait été comblé de bonheur, s'il était de ce monde que Dieu ait son âme et l'héberge dans son vaste paradis.

« J'aurais tant aimé que tu sois là pour voir ce que tu as réussi »

Au être plus chère à mon cœur, ma mère, qui a toujours cru en moi et m'encouragée.

Mes chères sœurs et chers frères, Aicha et Hassna, Abd Djabbar et Ahmed, qui m'ont soutenu durant les moments difficiles et à qui je souhaite beaucoup de réussite et du bonheur dans leur vie future.

Ma belle sœur Koltom, mon neveu Mabrouk Iyad et ma cousine Horya, et à qui je souhaite du bonheur.

Je clos ces remerciements en dédiant ce travail au peu d'amies que j'ai eues la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenue tout au long de ces années, et à qui je souhaite du bonheur, réussite et bonne santé.

A tous ceux qui sont chers et que j'ai omis involontairement de citer...

Résumé

L'étude du pouvoir acidifiant des neuf souches appartenant au genre *Leuconostoc*, ensemencé dans du lait écrémé reconstitué, a permis de mesurer le pH et l'acide produit en °D toutes les deux heures pendant 24h. Le suivi de la cinétique d'acidification de chaque souche a montré que les souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp* (26 et 36) ont une capacité acidifiante importante (soit une acidité ≥ 23 °D) correspondant à une DO et un taux d'UFC/mL à t=0h important, contrairement aux espèces : *leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (105), *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* (65), et *Leuconostoc lactis* (CIP102422) (soit une acidité ≤ 23 °D). Mais les valeurs maximales obtenues après 24 heures d'incubation à 30°C nous ont permis de conclure que nos souches testées de *leuconostoc* sont en général faiblement acidifiantes, en effet le genre *Leuconostoc* en technologie laitière est utilisé pour son pouvoir aromatisant et pour la production du CO₂ alors que la production d'acide est préconisée pour les **Lactocoques**.

Mots clés : pouvoir acidifiant, *Leuconostoc*, lait reconstitué, pH, acide

Abstract

The study of acidifying ability of nine strains belonging to the genus *Leuconostoc*, inoculated in skim reconstituted milk, allowed us to measure pH and the produced acid (in °D) every 2 hours for 24h. The following of acidification kinetics for each strain has shown that *Leuconostoc mesenteroides spp (36 et 26)*. Have an important acidifying ability (with acidity $\geq 23^{\circ}\text{D}$) corresponding to important OD and UFC/mL rate at t=0h, in contrast to *leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (105)*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum (65)* and *Leuconostoc lactis (CIP102422)* (with acidity $\leq 23^{\circ}\text{D}$). However, the maximal values obtained after 24 hours of incubation at 30°C allowed us to conclude that the tested strains of *Leuconostoc* are generally weakly acidifying. in fact, the genus *Leuconostoc* is used in dairy technologies for their flavoring ability and production of CO₂, while the production of acid is confined for Lactocoques.

Key words: acidifying ability, *Leuconostoc*, reconstituted milk, pH, acid.

الملخص

سمحت لنا دراسة قدرة التخمير لتسع سلالات تابعة لنوع *Leuconostoc* المستتبتة في الحليب خالي الدسم و المعاد تشكيله بقياس الأساس الهيدروجيني و الحمض المنتج بوحدة °D و هذا كل ساعتين لمدة 24 ساعة. أظهرت متابعة تطور درجة التخمير لكل سلالة بأن السلالات (*Leuconostoc mesenteroides ssp* (26 et 36) لديها قدرة تخمير مهمة (مع درجة حموضة $23^{\circ}\text{D} \leq$) متوافقة مع كثافة ضوئية و نسبة UFC/mL عالية عند بداية التجربة. و هذا على عكس السلالات *leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* (105) , *Leuconostoc mesenteroides subsp* (65) و *Leuconostoc lactis* (CIP 102422) (أي درجة حموضة $\geq 23^{\circ}\text{D}$) ولكن القيم القصوى المتحصل عليها بعد 24 ساعة من التحضين تحت درجة حرارة °C 30 سمحت لنا باستنتاج بأن السلالات المختبرة هي عموما ضعيفة التخمير، حيث يستعمل نوع *Leuconostoc* في تكنولوجيا الحليب لقدرته على إنتاج العطر النكهة و إنتاج غاز CO_2 فيما يقتصر إنتاج الأحماض على نوع *Lactocoques*.

الكلمات المفتاحية: قدرة التخمير، *Leuconostoc* ، الحليب المعاد تشكيله، الأس الهيدروجيني، الحمض.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Tableau 02 : Espèces du genre *Leuconostoc*.

Tableau 03 : Identification présomptive de *Leuconostoc* par des tests phénotypiques.

Tableau 04 : Souches utilisées et leurs origines.

Tableau 05 : Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/mL du lait) pour chaque souche après 24h d'incubation..

Tableau 06 : Résultats de la densité optique des souches étudiées.

Tableau 07 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 02 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Tableau 08 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 26 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Tableau 09 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 36 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Tableau 10 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 37 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Tableau 11 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 38 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Tableau 12 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 65 pendant 24h d'incubation à 30⁰C

Tableau 13 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche105 pendant 24h d'incubation à30⁰C

Tableau 14 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche CIP 102422 pendant 24h d'incubation à 30 ⁰C

Tableau 15 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche **CNRZ 77^T** pendant 24h d'incubation à 30 ⁰C.

Liste des figures

Figure 1 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (adapté de Dellaglio *et al.*, 1994; in Matamoros.,2008).

Figure 2 : Taxonomie des bactéries lactiques (Ludwig et al., 2009), basée sur la comparaison des séquences d'Adn 16rDNA.

Figure 3 : Images de *Leuconostoc*

Figure 4 : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* (Bourel et al, 2001).

Figure 5 : Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de leuconostocs selon leur séquence 16S rDNA (Gu et al, 2012).

Figure 6 : Titrimétrie.

Figure 7 : Colonies de la souche CNRZ 77^T (*leuconostoc misenteroides dxtranicum*) sur MRS solide après 24h d'incubations à 30 °C.

Figure 8 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 26.

Figure 9 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 36 .

Figure 10 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 02.

Figure 11 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 38.

Figure 12 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 37.

Figure 13 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 65.

Figure 14 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 105.

Figure 15 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche CIP 102422^T.

Figure 16 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche CNRZ 77^T.

Figure 17 : Cinétique d'acidification (a) et de pH (b) des neuf souches à 30 °C.

Figure18 : Colonies des neuf souches sur MRS solide après 24h d'incubations à 30 °C.

Table des matières

Résumé	
Abstract	
الملخص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Table des matières	
Introduction.....	01
<u>Partie 1 : Synthèse bibliographique</u>	
I. BACTERIES LACTIQUES.....	03
I.1. <i>Définition</i>	03
I.2. <i>Habitat</i>	03
I.3. <i>Rôle des bactéries lactiques</i>	05
I.3.1. Industrie alimentaire.....	05
I.3.1.1. Activités acidifiante	06
I.3.1.2. Activités protéolytiques	06
I.3.1.3. Production de bactériocines	07
I.3.1.4. Activité lipolytique	07
I.3.1.5. Texturation par libération d'exopolysaccharides	08
I.3.2. Domaine médical	10
I.3.2.1. Effets probiotiques	11
I.3.2.2. Activité hypocholestérolémiant e.....	12
I.3.2.3. Action anticarcinogène et action sur le système immunitaire	12
I.4. <i>Classification des bactéries lactiques</i>	12
II. GENRE <i>LEUCONOSTOC</i>	14
II.1. <i>Habitat</i>	15
II.2. <i>Rôle des leuconostoc</i>	15
II.2.1. Pouvoir acidifiant	16
II.2.2. Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux	18
II.2.3. Production de dextrane	20

II.3. <i>Classification des leuconostoc</i>	20
---------------------------------------------------	----

Partie 2 : Matériels et méthodes

I. Origine des bacteries utilisées.....	24
II. Revifiction.....	24
III. Préparation du lait.....	25
III.1. Ensemencement du lait.....	25
III.2. Mesure de la densité optique (DO).....	25
III.3. Mesure de pH et de l'acidité.....	25
• <i>Dosage de l'acidité</i>	25
• <i>Mesure de pH</i>	26
III.4. Dénombrement des bactéries présentes dans le lait à t_0	26

Partie 3 : Résultats et interprétation

I. Caractérisation macroscopiques.....	27
II. Dénombrement des colonies sur milieu gélosé	27
III. Mesure de la densité optique (DO).....	28
IV. Cinétique de l'acidification du lait en pH et en acide (0D).....	28

Partie 4 : Discussion

Discussion.....	33
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	37
Annexe 1	
Annexe 2	

Introduction

Les bactéries ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation. Ce n'est qu'à la fin de 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certains chercheurs ont pu isolé un streptocoque (**Poullain, 1994**). Pourtant, une étude appuyé sur des données de paléontologie, des données moléculaires basées sur les séquences des ADN ribosomiques et les séquences signatures de protéines conservées, ainsi que sur certaines caractéristiques du métabolisme carboné de ces bactéries montre que les bactéries lactiques seraient apparues sur terre il y a près de 3 milliards d'années (**Tailliez., 2001**).

Les bactéries lactiques possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une bioconversion optimale et d'une texture caractéristique des produits fermentés et transformés, comme les produits laitiers, les dérivés de matières premières agricoles, les produits alcoolisés, les viandes, etc... Ces atouts se situent dans l'aptitude à l'acidification, à l'aromatisation, à la protéolyse, ainsi les bactéries lactiques jouent un rôle hygiénique important en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables (**Hugenholtz, 2002 ; Guessas, 2005 et Dortu, 2009 in : Zarour 2012**). Le développement de l'industrie alimentaire, en particulier de l'industrie laitière, a permis de sélectionner de nouvelles souches à fort intérêt technologique par la connaissance de leur métabolisme, de leur physiologie, et de leur propriétés fonctionnelles.

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone.

L'objectif de cette étude est la caractérisation technologique de souches appartenant au genre *Leuconostoc*, à savoir leur pouvoir acidifiant. Pour cela, on a structuré cette étude de la façon suivante :

- Dans un premier temps, on a déterminé le taux des bactéries lactiques à $t=0h$ cultivées dans le lait reconstitué (Foster farms dairy dba Crystal creamery, USA), par mesure de la densité optique et par dénombrement sur gélose MRS.
- Puis, suivie du pouvoir acidifiant de neuf souches en réalisant la titration par NaOH et en mesurant le pH dans un intervalle de temps régulier pendant 24h

I. BACTERIES LACTIQUES

I.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimio organotrophes (De Roissart, 1986). Elles sont le plus souvent immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative. Elles poussent dans des conditions d'anaérobiose mais peuvent être aérotolérantes (Mayo et al., 2010 in Zarour., 2012). Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets (Bourjeois et Larpent, 1996). Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe parmi les bactéries à faible pourcentage de GC (Muto et Osawa, 1987 in : Matamoros., 2008).

Ces bactéries lactiques encore appelées bactéries de l'acide lactique sont caractérisées par leur aptitude à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (D(-), L(+) ou DL) tout en utilisant les voies cataboliques d'Embden Meyerhof-Parnas (EMP), de Dickens-Horecker et d'Etner Doudoroff (Savadogo et Traore., 2011).

Les bactéries lactiques sont dites homofermentaires lorsqu'elles sont capable de former 95% d'acide lactique; par contre elles sont hétérofermentaires lorsque d'autres composés comme l'éthanol et le CO₂ sont produits en même temps (Fuller, 2001 in : Sumarsih et al. 2012) (voire la figure 1). Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance : acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Larpent, 1989 ; Novel, 1993 in : Bekhouche., 2006).

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animal (Dortu et al., 2009 ; Mayo et al. , 2010 in Zarour et al., 2012) mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986).

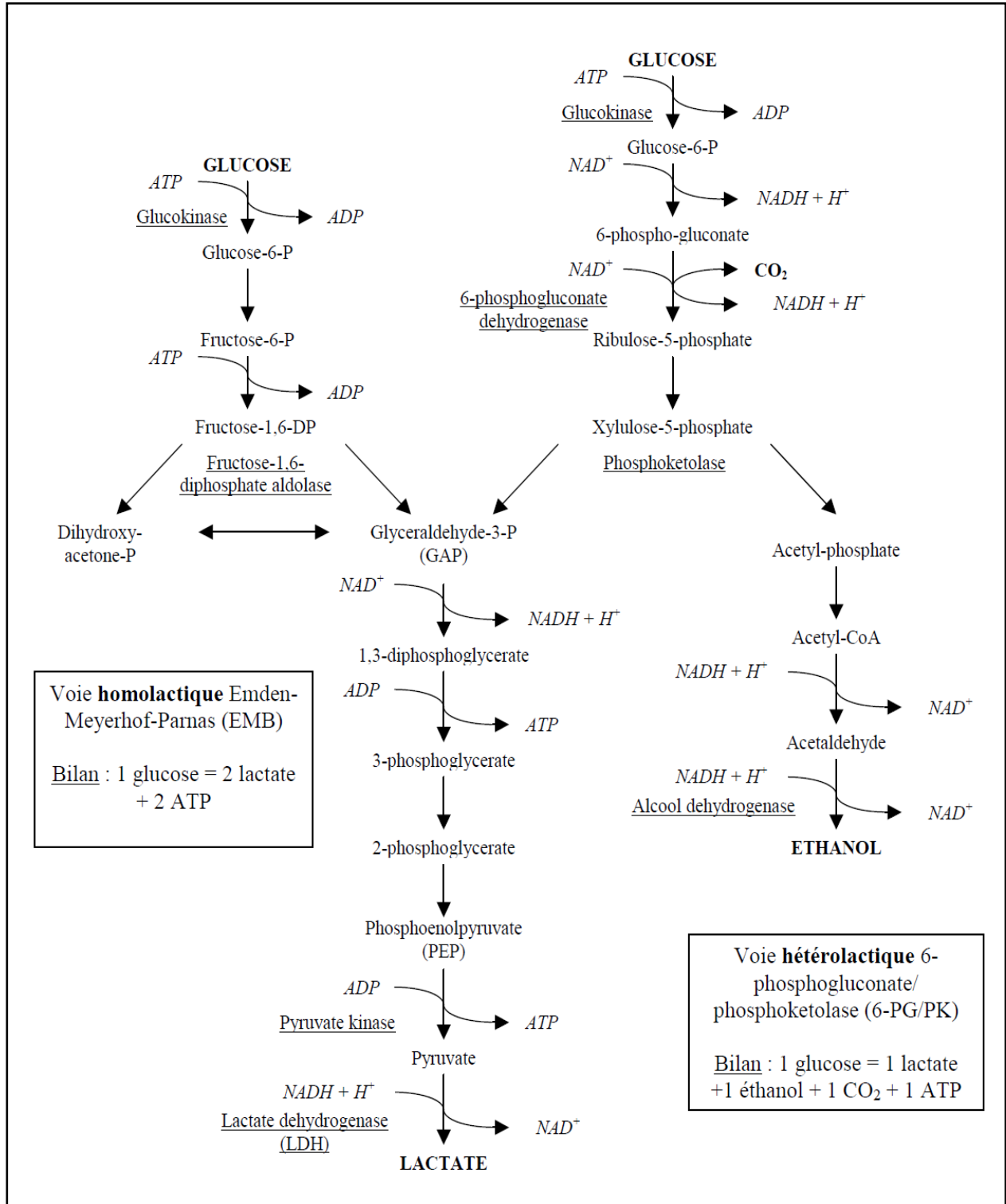


Figure 1 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (adapté de Dellaglio *et al.*, 1994; in Matamoros.,2008).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* a été isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé. **(Bergey's manual, 2009)**.

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages et les préparations culinaires (Saucisse, anchois salés ou sauce de soja). **(Bekhouche., 2006)**.

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb.casei subsp. casei*, *Lb. Plantarum*, *Lb. Curvatus* et *Lb.Brevis*), dans les laits fermentés (*Lb.kefir*, *Lb.brevis* et *Lb.fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. Brevis*, *Lb, curvatus*, *Lb. Buchneri* et *Lb. San francisco*) **(Desmaszeud, 1996)**.

I.3. Rôle des bactéries lactiques

I.3.1. Industrie alimentaire

Les bactéries lactiques 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. Elles contribuent aussi à la texture, à la saveur des aliments, et à la production de composés aromatiques **(Labioui et al., 2005)**. Ces fonctions sont assurées par leur :

I.3.1.1. Activité acidifiante

Le catabolisme fermentaire des hexoses conduit chez les bactéries lactiques à un fort abaissement du pH extracellulaire par la production en grande quantité d'acide lactique, ce qui est recherché dans la production des produits alimentaires, en particulier des produits laitiers. D'où l'acidification du lait permet :

- La coagulation du lait, et l'augmentation de la synérèse du caillé.
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final.
- La diminution du pH peut empêcher la croissance des autres micro-organismes, en particulier bactéries pathogènes (**Huang *et al*, 2004 in : Sumarsih et al., 2012**).
- La saveur, il est bien connu que des acides organiques sont considérés comme des composés aromatiques (**Imhof et Bosset, 1994 in : Bigret 1994**).

I.3.1.2 Activités protéolytiques

Il existe chez la majorité des bactéries lactiques des protéases extracellulaires ou protéase de paroi (**Gilbert et al., 1996 ; Pederson et al., 1999 ; Fernandes-Espla MD et al., 2000 ; Pastar et al., 2003 in : Mennet, 2009**). Les LAB contiennent entre une dizaine et une vingtaine de peptidases intracellulaires qui diffèrent à la fois par leur spécificité de substrat et leur mécanisme catalytique.

Outre l'impact sur la texture, l'action principale des enzymes impliquées dans le phénomène du protéolytique conduit.

- A la libération des peptides et des acides aminés libres, les composés d'arôme de par eux-mêmes.
- A la formation de plusieurs familles de composés aromatiques volatiles via l'action enzymatique, en utilisant des acides aminés comme substrats.

Les peptidases utilisent des peptides comme substrats et libèrent des plus petits peptides et acides aminés libres. Leur concentration dans le produit a été liée à l'intensité de la saveur **(Bouton et al. 1994 in : Bigret 1994)**.

Dans une deuxième phase, les décarboxylases, désaminases et transaminases produisent des aldéhydes, α -cetoacids, des alcools, des amines et des acides gras libres à partir des amino-acides **(Visser, 1993 ; Imhof et Bosset, 1994 in : Bigret 1994)**. Bien entendu, ces composés aromatisants volatils sont d'une grande importance sur la saveur globale du produit final.

I.3.1.3. Activité lipolytique

L'activité lipolytique des bactéries lactiques est moins importante que leurs activités protéolytiques. Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires.

Néanmoins, les voies métaboliques liées à la lipolyse génèrent des acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires. **(Bigret, 1994)**.

I.3.1.4. Production de bactériocines

Les traitements non-thermiques attirent l'intérêt de l'industrie alimentaire due à leurs possibilités d'assurer la qualité et la sûreté de l'aliment. Parmi eux, les bactériocines des bactéries lactiques, telles que la nisine, et les enterocines, peuvent être potentiellement utiles pour l'industrie laitière. **(Sobrino-Lopez et Martin-Belloso, 2007)**.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens sécrétés par les bactéries et leur synthèse s'effectue par voie ribosomique. Leur activité peut être bactéricide ou bactériostatique. Les bactéries lactiques, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, et *Streptococcus*, produisent de nombreuses bactériocines et présentent un intérêt pour l'application industrielle grâce à leur innocuité reconnue pour l'homme et par leur utilisation depuis tout temps dans l'alimentation. **(Calvez et al., 2009)**.

Parmi ces bactériocines, la nisine est sans doute la plus étudiée en raison de sa découverte plus ancienne et son utilisation dans le domaine agro-alimentaire (**Delves-Broughton, 1990 in : Calvez et al., 2009**). La nisine a une action contre un certain nombre de bactéries à Gram positif (*Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Mycobacterium*) et Gram négatives.

L'effet des lactocoques producteurs de nisine a été démontré pour la protection de fromages vis-à-vis de leur contamination par des *Clostridium* spp, ou *Listeria monocytogenes* (**Delves-Broughton et al., 1996 ; O'Sullivan et al., 2002 in : Morisset et al., 2005**).

La nisine était admise dans la liste européenne d'additif, où elle était assignée au nombre E234 (EEC, 1983). Elle est la seule bactériocine qui a été approuvée par l'organisation de la santé mondiale pour l'usage en tant que conservateur et elle est commercialisée comme poudre concentrée sèche. (**Sobrino-Lopez et Martin-Belloso, 2007**).

Les souches lactiques bactériocinogéniques peuvent être considérées comme un outil complémentaire pour la biopréservation et pour prévenir le développement des bactéries pathogènes (**Tableau 1**).

I.3.1.5. Texturation par libération d'exopolysaccharides

Certaines espèces de bactéries lactiques sont capables au cours de leur métabolisme de produire des exopolysaccharides (EPS) et de les libérer dans le milieu de culture (**Cerning et al. 1994 ; Topisirovic, 1994 ; Cerning, 1995 ; Grobber et al., 1995 ; Cerning, 1990 ; Champagne, 1998 ; Dupont, 1998 ; Gamar-Nourani et al., 1998 ; De Vuyst et Degeest, 1999 in : Savadogo et Traore., 2011**). Les exopolysaccharides sont des polymères exocellulaires constitués de résidus osidiques, aux propriétés texturants (**Marchall, 1993 in : Pernoud et al., 2005**).

Tableau 1 : Exemples des bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Espèce	Produit d'origine	Activité inhibitrice	Type d'activité	Essais	Référence
<i>Ec. faecium</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Alvarado <i>et al.</i> , 2005
<i>Lc. lactis</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	Fromage	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i>	Germes de luzerne	<i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> et <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
	Produits végétaux prêts à consommer		Acidification et bactériocine	In vitro	Wilderdyke <i>et al.</i> , 2004
<i>Ln.</i> <i>mesenteroides</i>	Salade de chou, maquereaux fumés	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. casei</i>	Légumes	<i>Ae. hydrophilia</i>	Bactériocine	Salade composée	Vescovo <i>et al.</i> , 1997
<i>Lb. plantarum</i>	Choucroute	<i>Listeria</i>	Acidification	Radis	Wilson <i>et al.</i> , 2005
	Bière	<i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Bactériocine	Salami	Todorov <i>et al.</i> , 2007
<i>Lb. sakei</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochetrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004
<i>Lb. curvatus</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochetrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004

La plupart des agents de texture sont des polysaccharides, susceptibles d'interagir avec les protéines laitières lors du traitement thermique ou de la fermentation (**Kruif et Tuinier, 2001 in : Pernoud et al., 2005**).

Les bactéries lactiques produisant des exopolysaccharides ont été utilisées dans la production de yaourt et de certains laits fermentés comme la crème. L'utilisation de souches productrices d'EPS comme ferment du yaourt améliore la rétention d'eau pour diminuer la synérèse, améliore la viscosité et peut remplacer le gras. (**LaPoint, 2009**).

En production de yaourt, les exopolysaccharides synthétisés durant la fermentation du lait ont la capacité d'influencer tant les propriétés rhéologiques qu'organoleptiques du produit fini (**Hess et al., 1997; Duboc et Mollet, 2001 in : Bullard, 2011**).

Dans la matrice caséique du yaourt, l'apparence du produit fermenté à l'aide d'une souche productrice d'EPS à caractère filant se veut plus crémeux, onctueux et lisse, mais la fermeté est souvent diminuée (**Hassan et al., 2003 ; Folkenberg et al., 2006; Ramchandran et Shah 2009, 2010 in : Bullard, 2011**).

Les exopolysaccharides interviennent non seulement dans le maintien des propriétés physico-chimiques du lait (texture, viscosité, arômes etc.) mais ils présentent aussi des effets curatifs dans les traitements de certaines maladies gastro-intestinales (**Hove et al., 1994 ; Heyman, 2000 ; Simakachorn et al., 2000 ; Isolauri, 2001 ; Soomro et al., 2002 in : Savadogo et Traor, 2011**),

I.3.2. domaine médical

C'est vraisemblablement Metchnikoff qui, le premier vers 1908, a suggéré d'utiliser les laits fermentés contenant une souche de lactobacilles, capables de vivre dans le tractus intestinal, comme composants d'une alimentation utile à la santé humaine. (**Savadogo et Traor; 2011**).

Beaucoup des 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. (**Renner, 1994**).

I.3.2.1. Effets probiotiques

Chez l'enfant, la diarrhée est une affection fréquente. La présomption du rôle protecteur des probiotiques contre les pathogènes intestinaux stimule leur utilisation dans ce type d'affections. De ce fait, de nombreux travaux rapportent que certaines bactéries lactiques réduiraient la durée, et/ou l'incidence de certaines formes de diarrhées chez l'enfant. (**Bernoud et al., 2005**).

Les bactéries lactiques peuvent prévenir les maladies gastrointestinales et les diarrhées (**Marteau et al., 1998 in : Savadogo et Traor., 2011**). Guandalini et ses collaborateurs en 2000 ont obtenu une guérison rapide des diarrhées à rotavirus de 287 enfants âgés de 1 à 36 mois administrés avec *Lactobacillus rhamnosus* GG comparés à ceux qui avaient reçu un placebo (**Savadogo et Traor, 2011**).

Les auteurs concluent que le lait fermenté pourrait influencer la fonction motrice du colon (**Pernoud et al., 2005**).

Un autre aspect intéressant est l'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme de la flore intestinale normale. Elles peuvent abaisser les quantités de certaines enzymes (β -glucuronidase, azoréductase ou nitroréductase) formées par cette flore. La réduction des activités de ces trois enzymes de la flore intestinale est intéressante, car elles sont associées à la formation de carcinogènes. (**Savadogo et Traor, 2011**).

L'ingestion de ferments lactiques peut contrer les effets d'une prolifération de certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli*. La fixation de LAB sur le tube digestif empêchent la colonisation de pathogènes, *Lb. acidophilus*, survivent beaucoup mieux dans l'intestin. Ce dernier germe a fait l'objet de développements industriels récents car il a été montré qu'il pouvait s'opposer à la prolifération de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium*, de *E. coli* entéropathogène ou de *Clostridium perfringens*, par divers mécanismes (production du peroxyde d'hydrogène et, des bactériocines dénommées « lactacin B », ou « lactacin F ». (**Savadogo et Traor, 2011**).

I.3.2.2. Activité hypocholestérolémiante

En 1985 Gilliland montre que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol. Les probiotiques semblent également posséder une action anticholestérolémiante. En effet, certaines bactéries lactiques inhibent la conversion de l'acétate en cholestérol. (**Savadoغو et Traor; 2011**). Les exopolysacchrides des bactéries lactiques incluent l'abaissement du cholestérol (**Nakajma et al., 1993 ; in : LaPointe, 2009**).

I.3.2.3. Action anticarcinogène et action sur le système immunitaire

Les bactéries lactiques semblent provoquer des réactions immunitaires in vivo. Les probiotiques stimulent la production d'immunoglobuline (Production d'Ig G2 chez des souris) suite à l'ingestion de yaourt. Le yaourt a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses en culture.

Plusieurs études ont démontré que les EPS ont une activité anti-cancérogène (**Savadoغو et Traor; 2011**). Aussi les exopolysacchrides des bactéries lactiques ont des propriétés anti-ulcère (dextrane sulfate) (**Shibata et al., 2000**), immunomodulante (**Charbot et al., 2001**) ou anti-inflammatoire (**Li et al., 2005**). (**LaPointe, 2009**).

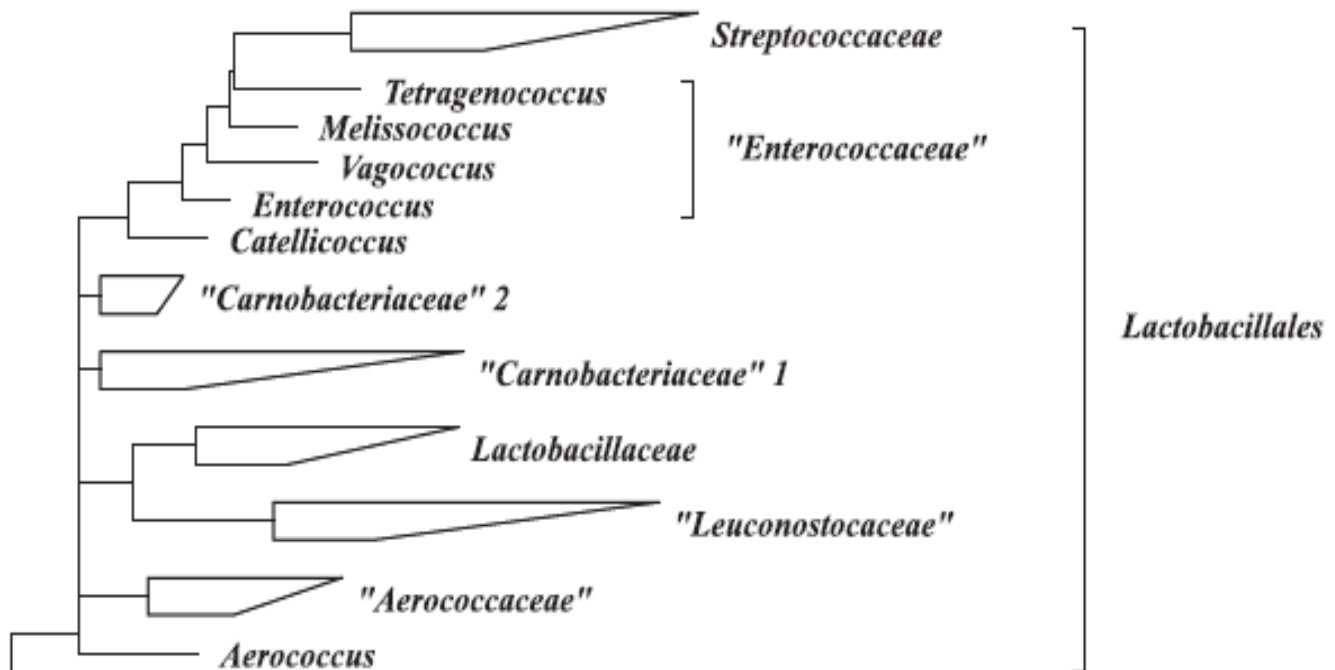
I.4. Classification des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des firmicutes et à cinq des six familles de l'ordre des lactobacillales (pas la famille II) (**figure 2**).

D'après **Ludwig et al. (2009)**, le phylum *Firmicutes* comprend trois classes *Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*



Order II. "Lactobacillales"

Family I. Lactobacillaceae^{AL}

- Genus I. *Lactobacillus*^{AL (T)}
- Genus II. *Paralactobacillus*^{VP}
- Genus III. *Pediococcus*^{AL}

Family II. "Aerococcaceae"

- Genus I. *Aerococcus*^{AL (T)}
- Genus II. *Abiotrophia*^{VP}
- Genus III. *Dolosicoccus*^{VP}
- Genus IV. *Eremococcus*^{VP}
- Genus V. *Facklamia*^{VP}
- Genus VI. *Globicatella*^{VP}
- Genus VII. *Ignavigranum*^{VP}

Family III. "Carnobacteriaceae"

- Genus I. *Carnobacterium*^{VP (T)}
- Genus II. *Alkalibacterium*^{VP}
- Genus III. *Allofustis*^{VP}
- Genus IV. *Alloiococcus*^{VP}
- Genus V. *Atopobacter*^{VP}
- Genus VI. *Atopococcus*^{VP}
- Genus VII. *Atopostipes*^{VP}

- Genus VIII. *Desemzia*^{VP}
- Genus IX. *Dolosigranulum*^{VP}
- Genus X. *Granulicatella*^{VP}
- Genus XI. *Isobaculum*^{VP}
- Genus XII. *Marinilactibacillus*^{VP}
- Genus XIII. *Trichococcus*^{VP}

Family IV. "Enterococcaceae"

- Genus I. *Enterococcus*^{VP (T)}
- Genus II. *Melissococcus*^{VP}
- Genus III. *Tetragenococcus*^{VP}
- Genus IV. *Vagococcus*^{VP}

Family V. "Leuconostocaceae"

- Genus I. *Leuconostoc*^{AL (T)}
- Genus II. *Oenococcus*^{VP}
- Genus III. *Weissella*^{VP}

Family VI. Streptococcaceae^{AL}

- Genus I. *Streptococcus*^{AL (T)}
- Genus II. *Lactococcus*^{VP}
- Genus III. *Lactovum*^{VP}

Figure 2 : Taxonomie des bactéries lactiques (Ludwig et al., 2009), basée sur la comparaison des séquences d'Adn 16rDNA.

II. GENRE *LEUCONOSTOC*

Le genre *Leuconostoc* a été défini par VAN THIEGHEM en 1878; le terme leuconostoc vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse et de *leuco* qui veut dire blanc (**Devoyod et Poullain, 1988**). Il appartient à la famille V des lactobacillales aux côtés des genres *Weisella* et *Oenococcus* (**figure 2**). Les premières souches ont été isolées lors d'accidents apparus dans des raffineries de sucre. Les leuconostocs se présentent sous forme de cellules sphériques immobiles, non pigmentés souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes. et en milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique: gaine qui rappelle celle des Nostocs (**Devoyod et Poullain, 1988**)



Figure 3 : Images de Leuconostoc

Les leuconostoc sont des bactéries lactiques hétérofermentaires, anaérobies facultatives, catalase-négatif, cocci Gram-positif (**Garvie, 1986 in : Ogier et al., 2008**) asporulées, sphériques, mésophiles(**Garvie, 1967 in : Bendimerad,2013**), ils se développent entre 20 et 30 °C pas à 45 °C, ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes (**Guiraud, 2003**). Le contenant de leur ADN en G+C est relativement bas (37-45 mol%).

Elles produisent l'acide lactique comme l'un des principaux produits finaux de la fermentation du sucre, et dans beaucoup de cas, elles produisent du dextrane à partir du sucrose (**Deilaglio et al., 1995 ; Garvie, 1986 in :Lee et al., 2005**).

La sélection pour *Leuconostoc* est facilitée par l'utilisation de la vancomycine dans le milieu de croissance, puisque toutes les espèces de *Leuconostoc* sont intrinsèquement résistant à la vancomycine (**Horowitz et al, 1987; Dyas et Chauhan, 1988 ; in : Ogier et al. 2008**).

II.1. *Habitat*

Les leuconostoc sont naturellement présents sur les végétaux. (en particulier la betterave à sucre d'où leur ancien nom de *Betacoccus*). On les retrouve dans le lait en particulier dans des nombreux laits fermentés et de nombreux fromages fabriqués à partir de lait cru de vache, brebis ou chèvre **(Devoyod et Poullain, 1988)**.

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *L. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *L. citreum* **(Cibik et al., 2000)**.

Leuconostoc n'est généralement pas considéré comme faisant partie de flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humaine, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel **(Auge et al., 1987; Vertet al., 1990; Heikkil.a et Saris, 2003 et Belloet al., 2003 in : Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004)**.

II.2. *Rôle des leuconostoc*

Les Leuconostocs constituent le troisième groupe important de bactéries lactiques, leur développement est peut abondant, mais ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentation industrielle **(Buckenhuskes, 1993 ; Caplice et Fitzgerald, 1999 et Steinkraus, 2002 in : Ogier et al., 2008)** tels que les saucisses fermentées, les légumes et les produits fermentées à base de céréales et les produits laitiers (par exemple, le beurre, crème, lait frais et crus, fromages).

Ils sont responsable de fermentation malo-lactique des vins (*Ln Oenos*), ils interviennent aussi dans les ensilages (*Ln mesenteroides*), et les végétaux fermentées : olives, choucroute, etc., mais aussi cacao et café **(Guiraud, 2003)**.

Les leuconostoc sont des hétérofermentaires, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO₂. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* **(Devoyod et Poullain, 1988)**.

Leur rôle dans la formation de l'arôme et la texture est essentiel. En particulier, *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis* métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la flaveur de fromage tel que diacétyl et acétoïne (Vedamuthu, 1994).

Leur métabolisme du citrate et des oses participent à l'aromatization des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de diacétyl et de CO₂, en inhibant les bactéries psychrotrophes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages (Vedamuthu, 1994).

Quelques autres espèces *Leuconostoc* peuvent induire une altération par production de composés indésirables (amines biogènes) dans les aliments, ou dextrane dans les processus de fermentation du sucre (Hemme et Foucaud-Scheunmann, 2004).

II.2.1. Pouvoir acidifiant

Le pH normal du lait est de 6.6. La plupart des microorganismes du lait sont capables de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraîne la coagulation de la caséine. Cette coagulation se produit à partir du pH 4,6. Les fermentations microbiennes responsables de l'acidification sont de type homo ou hétérolactique (Guiraud, 2003).

En dépit de l'intérêt industriel du *leuconostoc*, il y a un manque des données concernant le métabolisme des sucres du lait, lactose, galactose, et glucose par cette bactérie. Contrairement à *leuconostoc*, beaucoup de travaux ont été effectués sur le métabolisme du lactose par *Lactococcus* (McKay et al, 1969, 1970), *Lactobacillus* (O'Leary et Woychick, 1976), et *streptococcus thermophilus* sp. *salivarius* (Tinson et autres, 1982). (Huang et al., 1994).

Huang et ses collaborateurs (1994), dans leur étude sur l'utilisation des sucres et la biosynthèse de la β -galactosidase et galactokinase par *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*, ont montré que la β -galactosidase est synthétisée en présence du glucose, et plus faiblement en présence du lactose. La galactokinase réprimée par le glucose est induite par le lactose et le galactose.

Les leuconostocs produisant à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO₂, de l'éthanol et parfois même de l'acétate. Seule, l'espèce *Lc. lactis* est capable d'acidifier le lait ; au contraire, l'espèce *L. mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement (**Garvie, 1960**).

La présence de *Leuconostoc* stimule également la croissance des *Lactococcus*. Ces deux raisons expliquent pourquoi on inclut les *Leuconostoc* dans les starters de fermentation pour la production de beurre ou de fromages. (**Savadogo et Traore, 2011**).

Dans le lait, *L. mesenteroides* fonctionnent obligatoirement en association avec les lactocoques, qui initient leur croissance (**Vedamuthu, 1994**). En association, les lactocoques acidifient et les leuconostocs produisent des composés volatils à partir du citrate. Les lactocoques peuvent donc apporter aux leuconostocs des nutriments qui manquent à ces derniers dans le lait. A noter que cette association bénéfique a été décrite au profit de quelques souches de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* seulement parmi plusieurs testées (**Vedamuthu, 1994**). Ainsi, les leuconostocs servent peu à acidifier, mais sont complémentaires des lactocoques pour les caractéristiques sensorielles du produit laitier fini (ouverture et flaveur).

Les souches du leuconostoc croissent de façon associative avec les lactocoques, et sont utilisées pour leurs propriétés technologiques (principalement arôme et texture). Cette croissance associative entre ces deux groupes de bactéries a été étudiée en ce qui concerne le métabolisme de citrate et la formation d'arôme et a été décrite en tant qu'une relation fonctionnelle synergique. . Ainsi l'attention a été consacrée au taux de croissance, à la production d'acide et à la population finale de ces bactéries, qui reflètent également les interactions occurrence dans les cultures mélangées de souches *du leuconostoc* et *Lactococcus* (**Bellangier et al., 1999; Padmanabhan et Kim, 2002 in :Kihal et al., 2009**).

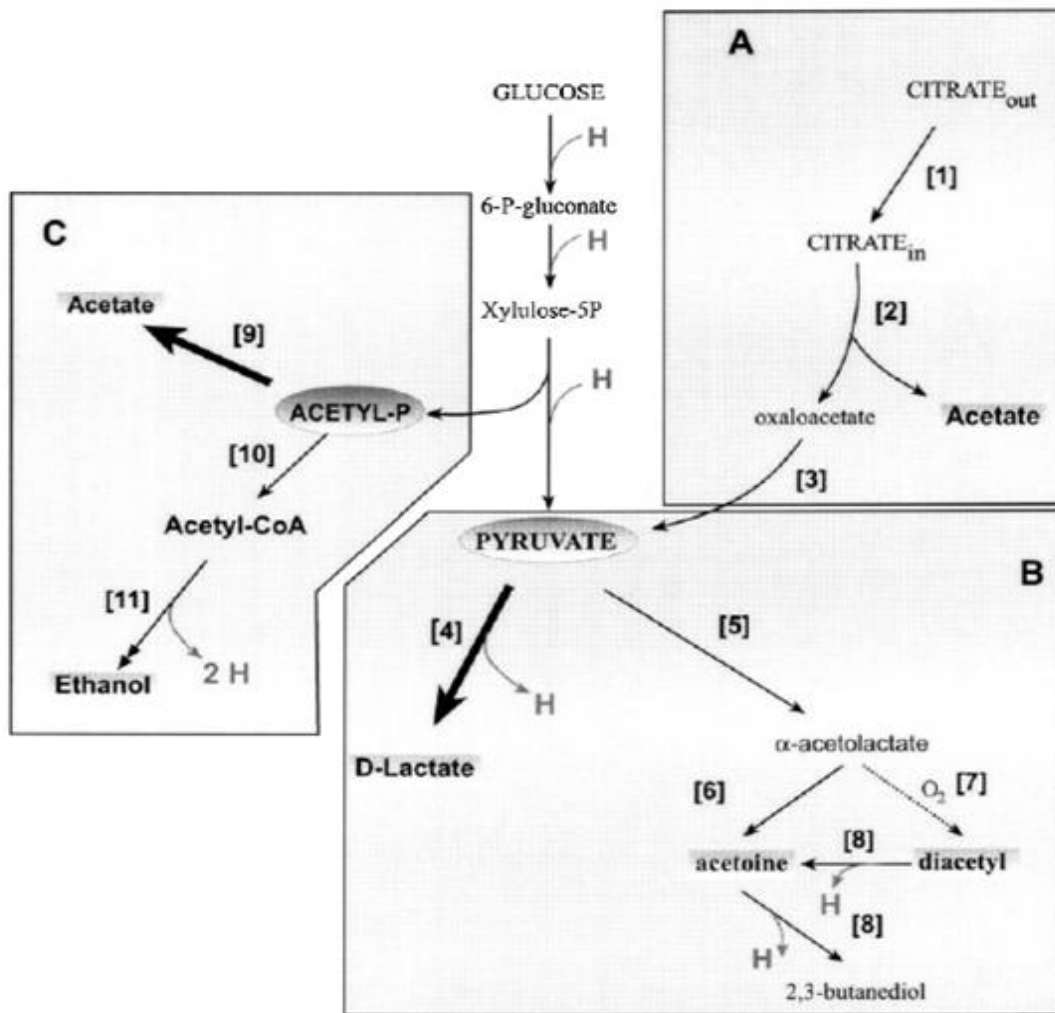
II.2.2. Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux

Malgré sa concentration relativement faible dans le lait (8 mmol L^{-1}), Le citrate est un constituant clef pour la formation du diacétyle, un composé volatile à l'arome de beurre qui est important dans les laits fermentés et les fromages frais. Chez les bactéries lactiques, *Leuconostoc* et *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* se distinguent par leur métabolisme fermentaire du citrate (Cit+). La **Figure 4** présente les principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques.

L'utilisation du citrate conduit à la formation du diacétyle, et d'autres composés comme l'acétate, acétoïne et 2,3-butanediol (McSweeney et Sousa, 2000 in : Hemme. Foucaud-Scheunemann, 2004).

La fermentation des hexoses chez le genre *leuconostoc* détermine la formation de quantités équimolaire de lactate, d'éthanol et CO_2 , Le cométabolisme sucre /citrate chez *leuconostoc* modifie l'hétérofermentation du sucre. Ces propriétés métaboliques sont mises en oeuvre lors de l'utilisation industrielle des *leuconostoc*.

- La production du CO_2 provenant de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation du citrate, est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront par la suite peuplés par la *Penicillium* produisant l'aspect veiné des fromages à pate persillée.
- Le diacétyle provenant de l'utilisation du citrate constitue le composé aromatique principal recherché dans les produits laitiers frais (beurre, fromage frais, crème fraîche). D'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol contribuent à la texture et à la saveur de ces produits laitiers.
- *Leuconostoc* est également capable de réduire l'acétaldéhyde produit par les lactocoques, qui est à l'origine d'un défaut de saveur, appelé goût d'herbe. (Bekal et al, 2009).



1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 α -acétolactate synthase, 6 α -acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase, 10 phosphotransacétylase, 11 alcool déshydrogénase.

Figure 4 : Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* (Bourel et al, 2001).

II.2.3. Production de dextrane

Le dextrane est un groupe de polysaccharides de haut poids moléculaire qui sont synthétisés à partir du saccharose et composée par des chaînes d'unités de D-glucose (**Kim et Robyt, 1995 in : Shah Ali UL et al., 2005**).

Le dextrane est produit par les espèces de *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Acetobacter*. **Hucker et Pederson (1930)** ont été les premiers qui ont rapporté la production de dextrane à partir du saccharose par les *Leuconostoc* (**Shah Ali UL et al., 2005**).

La souche *Ln. mesenteroides* NRRL b512F, est la plus utilisée commercialement, qui produit le dextrane hydrosoluble constitué de 95% de la liaison linéaire α -(1→6) et 5% de la liaison linéaire α -(1→3) (**Van Cleve et al., 1956 in : Shah Ali UL et al., 2005**).

Les dextrans industriels sont actuellement utilisés dans la fabrication de gel de filtration et comme diluant de volume sanguin et améliorant de la circulation sanguine (Hemme et al., 2004). En technologie laitière, le dextrane comme autre exopolysaccharides, est utilisé comme additif alimentaire, comme gélifiant par l'augmentation de la viscosité et comme stabilisant à travers le renforcement de rigidité du réseau de la caséine. En conséquence, les EPS améliore la stabilité du produit, ils jouent un rôle important dans la fabrication des laits fermentés, les crèmes, dessert à base du lait et du lait aromatisé (**Pucci et al., 1995; Duboc et al., 2001 ; Cooke et al., 2002., Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

II.3. Classification des *Leuconostoc*

Le genre *leuconostoc* est un groupe de bactéries lactiques, il regroupe 13 espèces:

L. mesenteroides, *L. lactis*, *L. gelidum*, *L.carnosum*, *L. citreum*, *L.pseudomesenteroides*, *L.fallax*, *L. argentinum*, *L.kimchii*, *L. gascomitatum*, *L.inhae*, *L.fructosum*, et *L. ficulnuem*. (**Deilaglio et al., 1995 ; Antunes et al., 2002 in : Lee et al., 2005**).

Leuconostoc.mesenteroides est la seule espèce à posséder des sous-espèces, au nombre de 4 actuellement : *Leuconostoc.mesenteroides subsp cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* (**Garvie, 1983 in: Lee et al., 2005**) (**Tableau 2**) (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

Tableau 2 : Espèces du genre *Leuconostoc*.

<i>Leuconostoc</i> species	Previous nomenclature	References
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> subsp. <i>dextranicum</i> subsp. <i>mesenteroides</i>		Garvie (1986)
<i>Ln. lactis</i>		Garvie (1986)
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>		Farrow et al. (1989)
<i>Ln. carnosum</i>		Shaw and Harding (1989)
<i>Ln. gelidum</i>		Shaw and Harding (1989)
<i>Ln. fallax</i>		Martinez-Murcia and Collins (1991)
<i>Ln. citreum</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>	Takahashi, Okada, Uchimura, and Kozaki (1992)
<i>Ln. argentinum</i>		Dicks, Fantuzzi, Gonzalez, Du Toit, and Dellaglio (1993)
<i>Ln. gasicomitatum</i>		Bjorkroth et al. (2000)
<i>Ln. kimchi</i>		Kim, Chun, and Han (2000)
<i>Ln. ficulneum</i>		Antunes et al. (2002)
<i>Ln. fructosum</i>	<i>Lactobacillus fructosus</i>	Antunes et al. (2002)
<i>Ln. inhae</i>		Kim, Lee, Jang, Kim, and Han (2003)

Leuconostoc mesenteroides subsp. *suionicum*, est une autre nouvelle sous-espèce proposée et décrite en 2012 (**Figure 4**). Cette sous-espèce se distingue en particulier des autres sous-espèces par son empreinte génétique avec les amorces (GTG) 5 (**Gu et al, 2012 in : Bendimerad, 2013**).

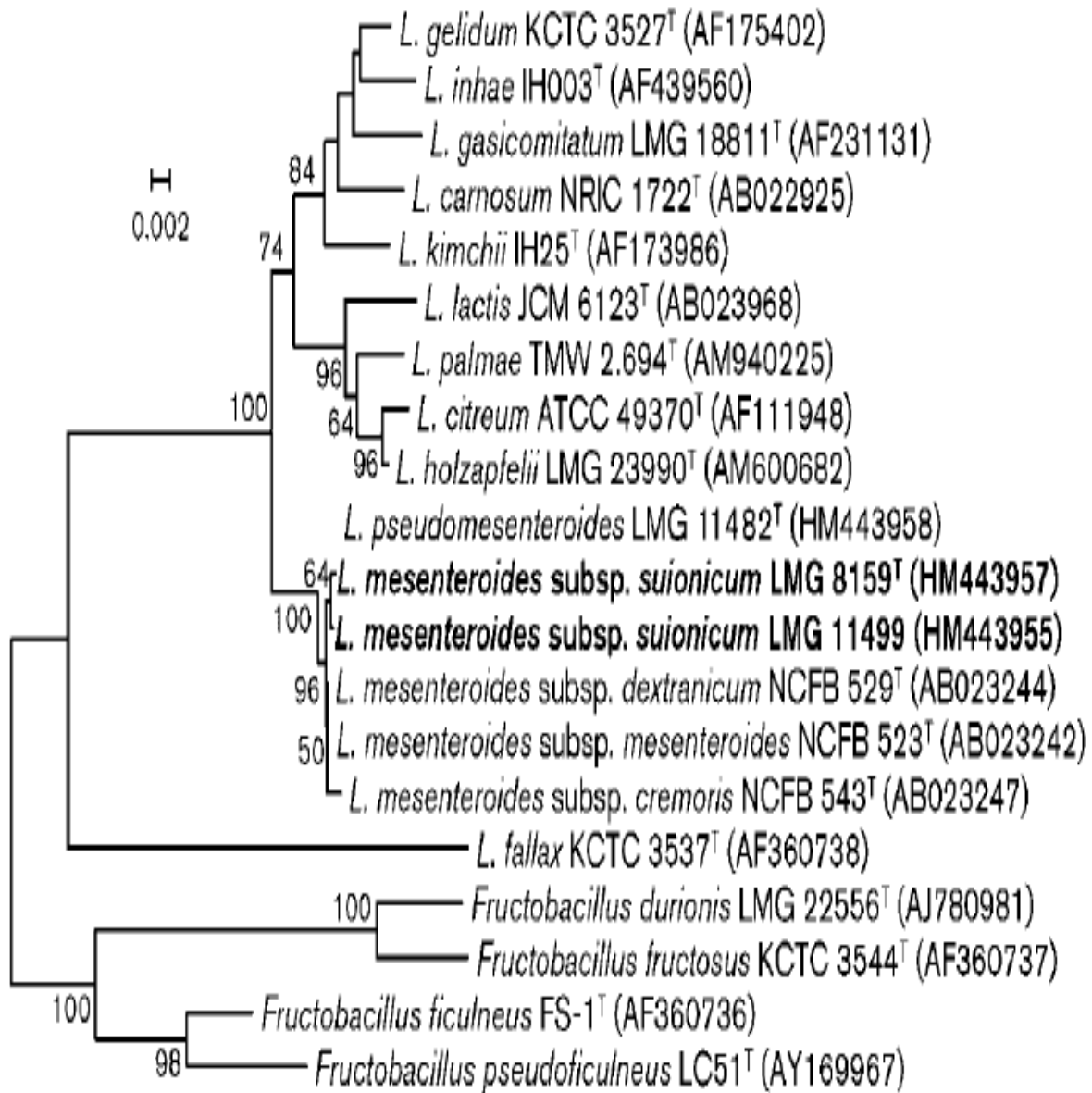


Figure 5 : Arbre montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de leuconostocs selon leur séquence 16S rDNA (Gu et al, 2012).

Les caractères phénotypiques ont été utilisés pendant longtemps pour isoler et caractériser les *Leuconostoc* et, parfois, pour faire la distinction entre des espèces ou sous-espèces (**Tableau 3**) (Hemme et Foucaud- Scheunemann, 2004).

Tableau 3 : Identification présomptive de *Leuconostoc* par des tests phénotypiques.

General characters

Gram-positive

Cocci (ovoid-shaped), non motile, non-sporeforming

Facultative anaerobic, catalase negative

Vancomycin resistant

Production of gas from glucose

No arginine hydrolysis

Production of D-lactate from glucose

Additional characters

Growth at 8°C, no growth at 45°C

No growth at pH 4.8

Growth with NaCl 7%

No H₂S formation

Acid production from: glucose (all strains); arabinose, arbutin, cellulose, cellobiose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, ribose, salicin, sucrose, trehalose, and xylose (variable within the species or subspecies)

Features of some species or subspecies

No production of slime from sucrose by *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. lactis*, *Ln. argentinum*

No acid production from fructose by *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (and some *Ln. argentinum* strains), from maltose by *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (and some *Ln. gelidum* strains)

No malate decarboxylation by *Ln. fallax*

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) Tlemcen.

I. Origine des bactéries utilisées :

Neufs souches des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc* ont été étudiées. L'origine, le nom et le code de ces souches sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Souches utilisées et leurs origines.

Souche	Genre/Espèce	Code	Origine
1	<i>Ln mesenteroides ssp</i>	02	Collection de Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE). Tlemcen
2	<i>Ln mesentroides ssp</i>	26	
3	<i>Ln mesentroides ssp</i>	36	
4	<i>Ln mesentroides ssp</i>	37	
5	<i>Ln mesentroides ssp</i>	38	
6	<i>Ln mesentroides dextranicum</i>	65	
7	<i>Ln mesentroides mesentroides</i>	105	
8	<i>Ln lactis</i> *	CIP 102422	INRA de Poligny (France)
9	<i>Ln mesentroides dextranicum</i>	CNRZ 77 ^T	

II. Revivification

A partir des souches conservées en cryotubes à -18°C, des pré-cultures successives ont été réalisées en bouillon MRS (**Man Rogosa et Sharpe, 1960**).

Dans un premier temps, les souches ont étéensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon MRS à pH=6,5. Après 18h d'incubation à 30°C, 0,5 ml ont été prélevé etensemencée dans 5ml de bouillon MRS stérile. Puis 1ml de ce bouillon a été repiqué dans 10 ml de MRS liquide puis incubée 18h à 30°C .

III. Préparation du lait

95g de lait écrémé en poudre (Foster farms dairy dba Crystal creamery , 415 Kansas Avenue, Modesto, California) ont été mélangé à 950 ml d'eau distillée stérile (95 g/950 ml)

200 ml de ce lait reconstitué sont distribué dans des flacons de 250 ml puis autoclaves pendant 15 min à 121 °C.

III.1. Ensemencement du lait

10ml de chaque culture sont centrifugés à 8500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Après l'élimination du surnageant, le culot est mélangé à 2,1 ml de lait écrémé reconstitué stérile (Foster farms dairy dba Crystal creamery) De ce mélange, 0,1ml sert à mesurer la DO et les 2 ml restant sont ensemencé dans un flacon contenant 200ml de lait stérile. Après homogénéisation du contenu du flacon, on distribue 15ml de lait ensemencé dans des tubes à essai stérile pour chaque souche. 5ml à part permettant de mesurer le pH et 10ml pour la mesure de l'acidité, puis les tubes sont incubés à 30°C au bain Marie.

A partir du lait ensemencé restant dans le flacon on prend 1ml pour faire une dilution au 1/10 dans de l'eau peptones tamponnée.

III.2. Mesure de la densité optique (DO)

La mesure de la DO est effectuée au spectrophotomètre (JENWAY) à 620nm (DO₆₂₀) sur 100 µl (0,1 ml) de suspension bactérienne diluée au 1/10 dans 900 µl d'une solution d'E.D.T.A (**EthylenDiamine Titracetic Acide Disodium**) à 2g/L pH=12 contre blanc 100 µl de lait écrémé reconstitué dilué au 1/10 dans la même solution d'E.D.T.A.

III.3. Mesure de pH et de l'acidité

Les valeurs du pH et de l'acidité ont été mesurées à tous les deux heures de t=0 jusqu'à t=24 h.

- **Dosage de l'acidité**

Cette méthode a pour but de déterminer par titration la concentration molaire en ions H₃O⁺ dans un échantillon de lait. Cette concentration est exprimée en « degrés Dornic ».

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait, est effectué toute les deux heures selon la méthode normalisée par titrimétrie en utilisant une solution de NaOH à N/18, le titrage se fait sous agitation en présence de phénolphtaléine. L'acidité titrable du lait a

été exprimée en degrés Dornic ($^{\circ}\text{D}$) puis convertie en g/l selon la formule : 1ml de NaOH correspond à 10 $^{\circ}\text{D}$ et un degré Dornic correspond à 0,01 % d'acide lactique.

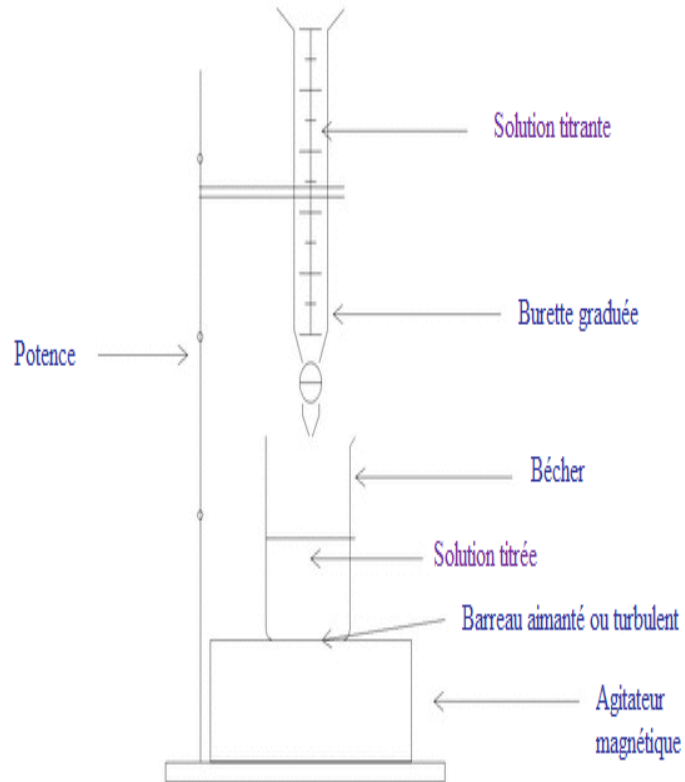


Figure 6 : Titrimétrie.

- *Mesure de pH*

Les mesures du pH du laitensemencé de la souche lactique se fait à l'aide d'un pH mètre type (HANNA).

III.4. Dénombrement des bactéries présentes dans le lait à t_0 :

A partir du laitensemencé restant dans le flacon, on réalise des dilutions décimales avec l'eau peptonée, pour atteindre 1/100 000 afin de prévoir des dilutions compatibles avec un niveau de cellules de 10^6 à 10^7 /ml, 0,1 ml des deux dernières dilutions (10^{-4} et 10^{-5}) sont étalé par râteau. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h.

I. Caractérisation macroscopiques:

Sur milieu MRS solide, les souches apparaissent comme des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire et de couleur blanchâtre (voir figure 7).

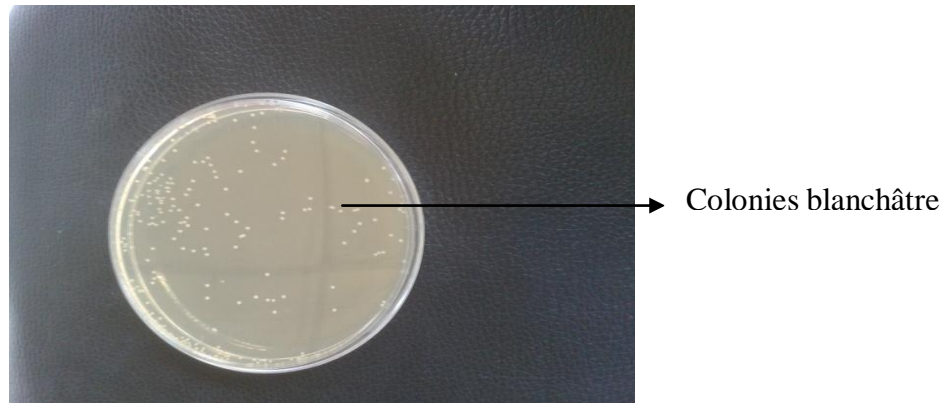


Figure 7 : Colonies de la souche CNRZ 77^T (*leuconostoc misenteroides dxtranicum*) sur MRS solide après 24h d'incubations à 30 °C.

II. Dénombrement des colonies sur milieu gélosé

Après dénombrement des colonies sur géloses MRS des toutes les souches à t=0h, le nombre de germes trouvés est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Nombre moyen de colonies dénombrées (UFC/mL du lait) pour chaque souche.

Souche	Nombre de colonie (UFC/mL du lait)		
	Dilution 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻⁴	Dilution 10 ⁻⁵
2	IND	/	/
26	IND	/	/
36	IND	/	/
37	IND	151	67
38	IND	/	/
65	IND	/	/
105	IND	85	26
CIP 102422 ^T	IND	/	/
CNRZ 77 ^T	IND	119	49

IND : indénombrable.

Les souches 38 ; 105 et CNRZ 77^T ont un développement très lent par rapport aux autres souches.

III. Valeurs de la densité optique (DO)

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la densité optique à t=0 h de chaque souche en comparaisons avec la DO₆₈₀ du blanc (DO₆₈₀=0.38),

Tableau 6 : Résultats de la densité optique des souches étudiées.

Souche	Blanc	2	26	36	37	38	65	105	CIP 306	CNRZ 77 ^T
DO ₆₈₀	0,38	0,54	0,80	0,56	0,56	0,80	0,52	0,56	0,51	0,80

Les souches 26 ; 38 ; CNRZ 77^T ont une densité optique importante de 0,80, par rapport aux DO des souches CIP 102422^T et 65 qui sont très faibles alors que les souches 2 ; 36 ; 37 ; 105 ont des DO moyennes.

IV. Cinétique de l'acidification du lait en pH et en acide (⁰D)

Le suivi de l'acidité du lait en pH et en acide pendant 24h d'incubation à 30 °C pour les neuf souches nous a permis de tracer les figures suivantes en utilisant le logiciel GraphPadPrism 5 Demo.

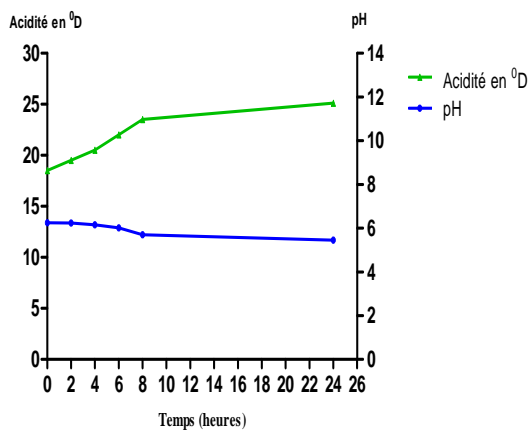


Figure 8: Cinétique d'acidification et de pH de la souche 26

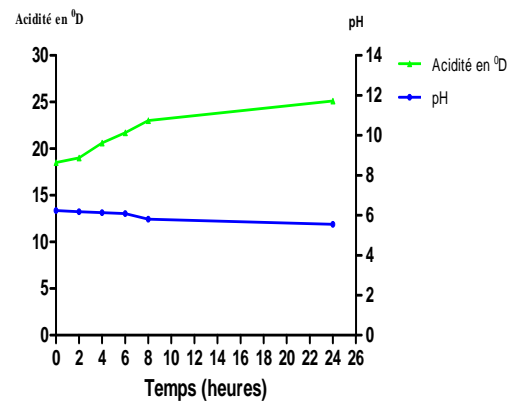


Figure 9: Cinétique d'acidification et de pH de la souche 36

La diminution du pH pendant les huit premières heures montre une production importante d'acide (voir tableau 8 et 9 en annexe1) pour les souches 26 et 36. Cette activité ralentie après jusqu'à 24heures.

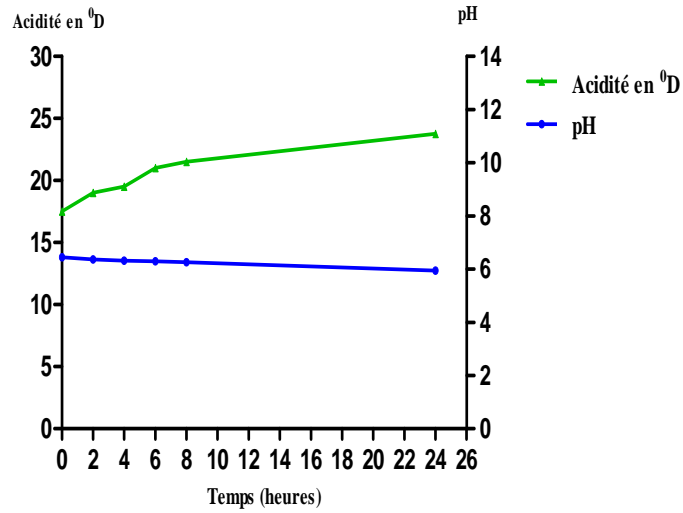


Figure 10: Cinétique d'acidification et de pH de la souche 02

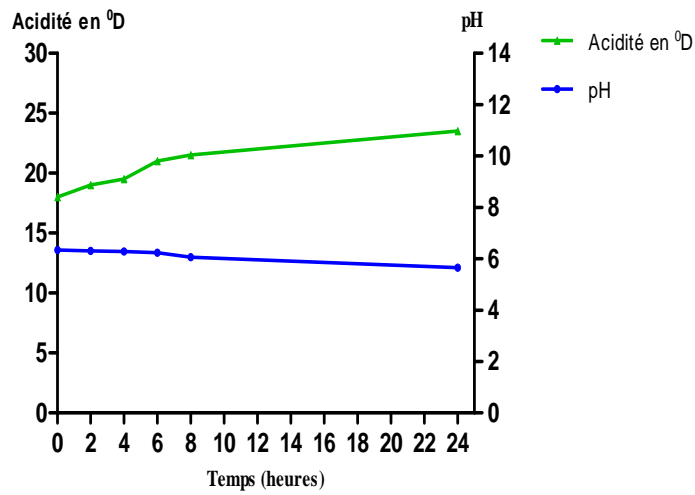


Figure 11: Cinétique d'acidification et de pH de la souche 38

Pour les deux souches 02 et 38 l'activité acidifiante augmente à $t=0h$ puis ralentit et devient presque stationnaire entre $t=2h$ et $t=4h$. Après 4h elle augmente de nouveau.

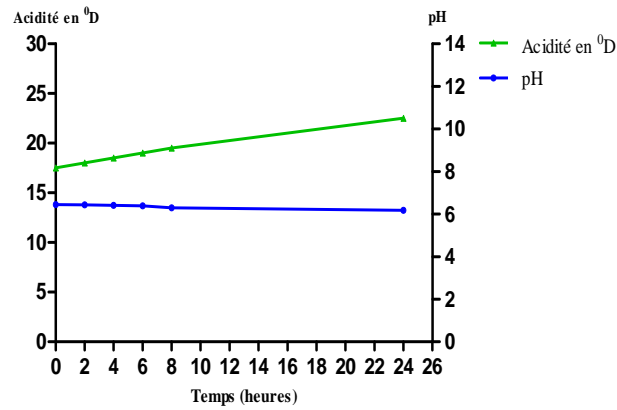


Figure 12: Cinétique d'acidification et de pH de la souche 37

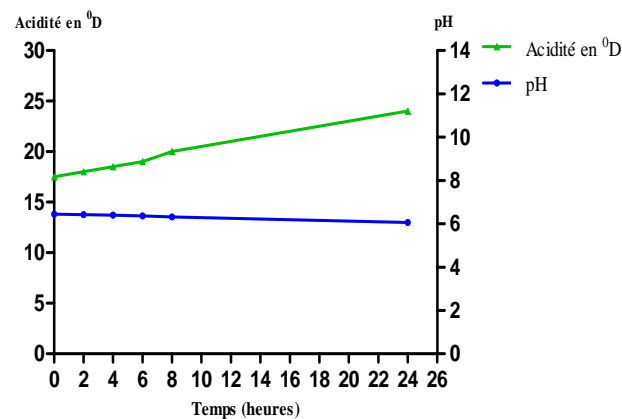


Figure 13 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 65

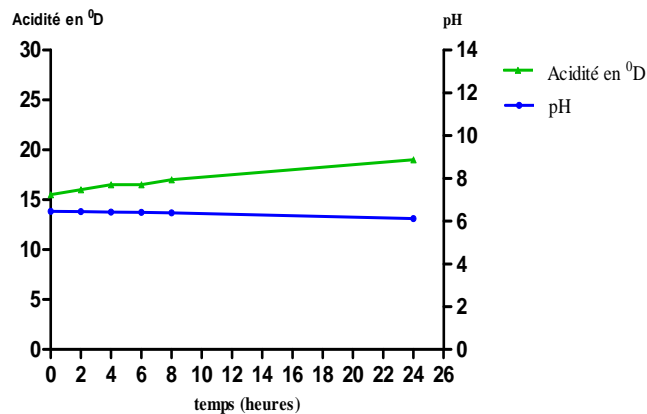


Figure 14 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche 105

La diminution du pH et la production d'acide se font lentement de $t=0h$ jusqu'à 24 h pour les trois souches 37, 65 et 105.

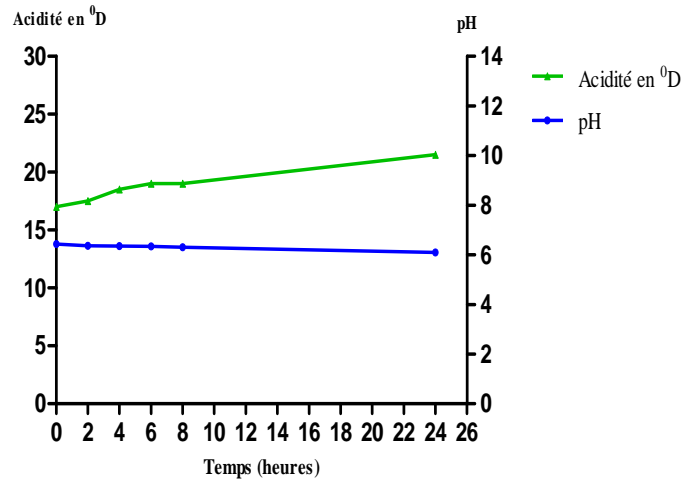


Figure 15: Cinétique d'acidification et de pH de la souche CIP 10 2422

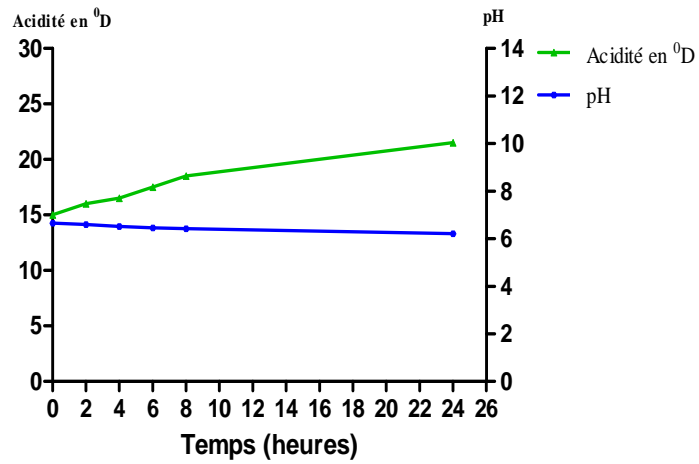


Figure 16 : Cinétique d'acidification et de pH de la souche CNRZ 77

L'activité acidifiante et la diminution du pH deviennent plus au moins importantes après 8h.

Les 9 souches sont positionnées le long de l'axe horizontal par capacité acidifiante croissante.

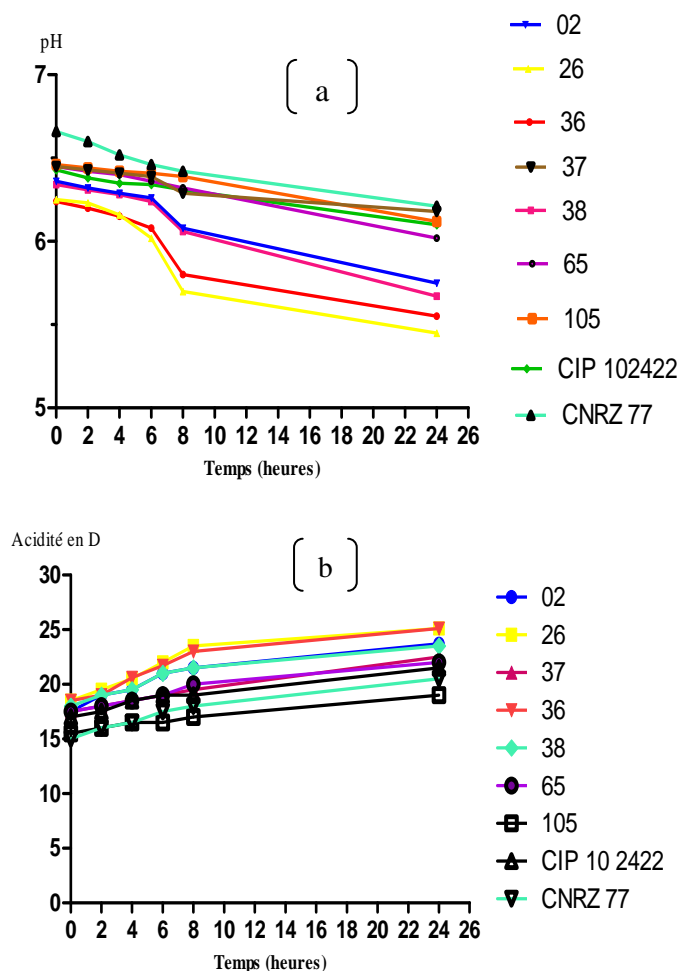


Figure 17 : Cinétique d'acidification (a) et de pH (b) des neuf souches à 30 °C.

Les souches 26 et 36 sont les plus acidifiantes (25.1 °D) (**figure 17 (a)**) dont l'acidité produite correspondant aux pH les plus bas est presque la même.

A part les deux souches 02 et 38 qui sont moyennement acidifiantes toutes les autres souches sont faiblement acidifiantes dont la 105 et CNRZ77 sont les moins actives (19 °D ; 21.5 °D) (**Figure 17 a et b**).

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Le pouvoir acidifiant des souches lactiques demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière. La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirée des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien (**Schmidt et al., 1994**).

Dans le présent travail, nous avons testé le pouvoir acidifiant des souches lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*. La cinétique d'acidification de ces bactéries est variable d'une souche à l'autre (**figure 17**). En effet les souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp* (26,36, 02, 38) sont les plus acidifiantes (soit une acidité ≥ 23 °D) ceci explique la DO élevé des souches 26 et 38 initialement (**Tableau 6**) et le taux très élevé des souches 26, 38, 02 et 36 (IND) à la dilution 10^{-3} au temps $t=0$ (**voir Tableau 5**). La quantité d'acide la plus élevée à été enregistrée surtout chez les souches 26 et 36. Les souches de *Ln mesenteroides subsp dextranicum* (65 et CNRZ 77^T), *Ln mesenteroides subsp mesenteroides* (105), et *Ln lactis* (CIP 102422^T), sont faiblement acidifiantes (soit une acidité ≤ 23 °D), les valeurs d'acidité les plus basses correspondant aux valeurs du pH les plus élevées (6,12 et 6.21) ont été enregistrées chez les souches 105 et CNRZ 77^T (**figure 17. a et b**).

Le temps d'incubation influe positivement sur le rendement de certaines souches. En effet à partir de 6h la souche 65 produit plus d'acide et son pH diminue plus, par rapport à la souche CNRZ 77^T qui est de la même espèce et par rapport à la souche 105 qui est faiblement acidifiante aussi.

Les travaux de **Zarour (2010)** ont montrés que les souches de *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* n'ont pas un pouvoir acidifiant important vu qu'il y a une diminution de pH très faible de 6,5 à 5,3 pendant 72 heures incubation. Alors que notre souche 105 appartenant à la sous espèce *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* ne possède pas aussi un grand pouvoir acidifiant puisque le pH diminue de 6,46 à 6.12 pendant 24h.

En effet la capacité acidifiante de nos souches de *Leuconostoc* est très faible par rapport aux résultats des travaux de **Cardamone et al (2011)**, qui ont montrés que des souches de *Leuconostoc* appartenant aux espèces *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *leuconostoc garlicum*, *leuconostoc citreum* et *leuconostoc pseudomesenteroides* acidifient le lait jusqu'à des valeurs de pH entre 4,78 et 4,86 après 24 h d'incubation.

Aussi la quantité d'acide lactique produite par nos souches après 24 heures d'incubation à 30 °C est qui est entre 19 °D et 25°D confirme que nos bactéries sont faiblement acidifiantes, ce qui est cohérent avec les travaux de **Devoyod et Poullain, (1988)** sur le genre *Leuconostoc*.

D'après une étude faite par **Tantaoui-El Araki et al. (1983)** sur le Lben marocain, le genre *Leuconostoc* soit les espèces *Ln. cremoris* et *Ln. lactis* peuvent être responsables de l'acidification du lait au cours de sa transformation en Lben mais ils doivent être en association avec les espèces de *Streptococcus* lactiques comme *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*.

Bellengier et al (1997), ont prouvé aussi que l'acidification d'un lait reconstitué est dû à l'action d'une culture mixte de *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* avec *Lactococcus lactis* ou à l'action de *Lc. Lactis* pure. Le taux d'acidification en cultures mixtes et en cultures pures ont été comparables, sauf lorsque le pourcentage de *Lc. lactis* était inférieur à 12%.

Dans le même cadre, **Laitier et al (2004)** dans leur étude sur les facteurs de maîtrise de l'acidification en technologies fromagères fermières (caillés lactiques) utilisant du lactosérum comme ferment, ont observé qu'en présence d'une charge élevée de *leuconostocs* l'acidification du lait est ralentie et moins importante (pH finaux plus élevés).

Hache et al, (1999) ont rapporté que *Ln. mesenteroides* était incapable d'acidifier le milieu à un pH inférieur à 5,9, ceci concorde avec nos résultats où on n'a pas enregistré des valeurs de pH inférieurs à cette valeur, alors que les espèces de *Ln. cremoris* et *Ln. lactis* pouvaient acidifier le lait à des pH inférieurs à 5,4. La différence dans la quantité d'acide produite entre les souches lactiques est influencée par une différence dans le système de transport des composés fermentescibles du milieu vers le cytoplasme cellulaire. (**Albenzino et al. (2001)**).

Il existe principalement deux types de systèmes de transport et catabolisme chez les bactéries lactiques (**LacS** et **PTS**), les composantes de ces systèmes sont différentes au sein des LAB, mais aussi d'un genre bactérien voire d'une espèce. (**Aflan, 1996**).

Fitzgerald et al. (1992) ont observé une forte baisse dans l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase à des pH inférieurs à 6,0 mais pour l'espèce *Ln.lactis* seulement. (**Hache et al., 1999**).

Selon **Cachon et Divies, (1994)**, l'accumulation des acides carboxyliques dans la cellule aurait un effet inhibiteur de la croissance et du métabolisme cellulaire. (**Hache et al., 1999**).

Cet effet inhibiteur du pH acide sur la croissance des bactéries lactiques dépend de la capacité de ces bactéries à contrôler le gradient de pH à travers la membrane cellulaire pour maintenir l'homéostasie (équilibre) du pH_i qui a un rôle important dans la physiologie de la cellule. McDonald et al. (1990) ont rapporté que le pH_i de 5,4 est limite de croissance des souches de *Ln. mesenteroides*. Ainsi la bactérie dépense la majeure partie de son énergie pour maintenir l'équilibre du pH_i au lieu de se développer.

D'après **Huang et al., (1994)** les souches de *Ln. mesenteroides* et particulièrement *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* ne sont pas utilisées comme des starters acidifiants mais plutôt pour leur pouvoir aromatisant vue qu'elle produisent l'acétoïne et le diacétyle,. Nos souches aussi sont faiblement acidifiantes donc on ne peut pas les utilisées dans l'avenir comme starters pour la fermentation mais peuvent être probablement des starters pour le pouvoir aromatisant et le pouvoir gazeux.

Conclusion :

L'étude de la cinétique d'acidification en pH et en acide des neuf souches de la collection de LAAMABE , appartenant au genre *Leuconostoc* (26 et 36), montre que les souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp* ont une capacité acidifiante importante (soit une acidité ≥ 23 °D) par rapport aux autres sous espèces: *leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*(105), *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum* (65), et *Leuconostoc lactis* (CIP 102422) (soit une acidité ≤ 23 °D).

Cependant les valeurs maximales de pH (5,45) et d'acide (25,1 °D) produite après 24 heures d'incubation reste toujours faibles par rapport à la norme malgré une DO initiale élevé (0.80) et un taux de croissance important soit IND à la dilution 10^{-3} . Ceci nous permet de conclure que nos souches testées ne peuvent pas être utilisée à l'état pure dans la production d'acide au cours des fermentations mais en cultures mixtes. Néanmoins elles peuvent être aussi préconisées dans l'avenir pour être utilisé comme starter dans la production des composés aromatiques et dans la production de CO₂.

Références bibliographiques

Atlan, D., 1996 . Les connaissances acquises chez les lactocoques sont-elles transposables aux autres bactéries lactiques ?. *Lait*. 76, 129-137. INRA. Villeurbanne cedex, France.

Bekal, S., Belguesmia, Y., Drider, D., et Prevost, H., 2009. Métabolisme des bactéries lactiques. Le citrate in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles ; Métabolisme des bactéries lactiques. 52 p. Ed ECONOMICA 49, rue Héricart, Paris.

Bekhouche, F., 2006. Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état. Option : Génie alimentaire.

Bellengier,P., Richard, J., et Foucaud, C., 1997. Associative Growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* Strains in Milk. American Dairy Science Association.

Bendimerad, N., 2013. Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben». Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie alimentaire. Faculté des sciences. Département de biologie. Laboratoire de microbiologie appliquée.

Bergey's Manual., 2009. Systematic Bacteriology. Second edition. 3: 625.

Bigret, M., 1994. Lactic acid bacteria and organoleptic properties of foods in: Novel G et Le Querler J-F. Les bactéries lactiques. Actes du colloque Lactic 94 Caen 7-9 septembre 1994. pp 25-27. Presses universitaire de Caen. France.

Bourgeois, C.M., et Larpent, J.P., 1996. Microbiologie alimentaire T2 ; aliments fermentés et fermentations alimentaires 523 p. Ed Technique et Documentation.

Bullard, J., 2011. Interactions de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides et effets sur les propriétés rhéologiques du yaourt. Thèse de doctorat . Sciences et technologie des aliments. Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval.

Calvez, S., Belguesmia, Y., Kergourlay, G., Prévost, H., et Drider D. 2009. Les bactériocines : de la synthèse aux applications in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. 110 p. Ed ECONOMICA. Paris.

Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., Emanuela Fornasari, M., Jorge Alberto Reinheimer, J. A., et Guglielmotti, D. M., 2011. Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. Dairy Sci. et Technol. 91:457–470. INRA and Springer Science+Business Media B.V.

Cibik, R., Lepage, E., et Tailliez, P., 2000. Molecular Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* Isolated from Traditional French Cheeses as Revealed by RAPD Fingerprinting, 16S rDNA Sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification. Systematic and Applied Microbiology 23, 267-278. France.

De Roissard, H. B., 1986. Bactéries lactiques dans le lait et produits laitiers Ed technique et documentation. 445p. Lavoisier. Paris.

Desmazeaud, M., 1996. Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaines : utilisation et innocuité. Cahiers Agricultures, 5, pp : 331-343.

Devoyod, J. J., Poullain, F., 1988 .Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière. Le Lait. 68 : 249-280. INRA. Jouy-en-Josas, France.

Guiraud, J.P., (2003). Microbiologie alimentaire. pp 91-116. RIA. Dunod, Paris.

Hache, C., Cachon, R., Wache, Y., Belguendouz, T., Rioondet, C., Deraede, A., et Diviis, C., 1999. Influence of Lactose-Citrate Co-metabolism on the Differences of Growth and Energetics in *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc*. System.. Appl. Microbial. 22, 507-513. INRA. INSBANA. France.

Références bibliographiques

Hemme, D., et Foucaud-Scheunemann, C., 2004. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14 467–494. INSBANA. France.

Huang, DQ., Prévost, H., et Diviès, C., 1994. Interrelationship of sugar metabolism (glucose, galactose, lactose) by *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*. *Lait* :74, 207-215. Elsevier/INRA. France.

Kihal, M., Prevost, H., Henni, D.E., Benmechernene, Z., et Diviès, C., 2007. Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2 (2): 62-68. ENSBANA, 1 Esplanade Erasme.France.

Labioui, H., Elmoualdi. L., EL Yachioui, M., et Oussine, M., Selection de souches de bacteries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*.144, 237-250.

Laitier, C., Chatelin, T.M., David, V., Tormo, H., Lefrileux, Y., et Gauzere, Y., 2011. Facteurs de maîtrise de l'acidification dans les technologies fromagères fermières (caillés lactiques) utilisant du lactosérum comme ferment. Institut de l'Elevage Actipôle. Lyon.

LaPointe, G., 2009. La production d'exopolysacchrides in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles75p. Ed ECONOMICA .Paris.

Lee, S., Hoon Choi. J., Soon Kim,Y., et Hang Kyung. K. (2005). Characterization of New *Leuconostoc* Species Isolated From Fresh Garlic. *Fppd Sci. Biotechnol.* Vol. 14. No. 3. pp.416-419. Sejong university. Korea.

Ludwig, W., Schleifer, K.H., et Whitman,W.B., 2009. Order II Lactobacillales, revised road map to the phylum *Firmicutes*. ord. nov. In: Devos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., and Whitman, W.B (eds) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, volume 3 (The Firmicutes), p 484. Springer Dordrecht, Heidelberg, Germany.

Références bibliographiques

Mami, A., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en algérie. Thèse de doctorat. Spécialité microbiologie appliquée.

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.

Mennet, V., 2009. Les aides aminés in : Drider D et prévost H. Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles ; Métabolisme des bactéries lactiques. pp 19-22. Ed ECONOMICA. Paris.

Morisset, D., Berjeaud, J-M., Frère, J., et Héchard, Y., 2005. Bactériocines des bactéries lactiques in : Luquet F-M et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. 113p. Ed Lavoisier. Paris.

Ogier, J.-C., Casalta, E., Farrokh, C., et Saïhi, A., 2008 Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. International Journal of Food Microbiology 126 286–290.

Pernaud, S., Schneid-Citrain, N., Agnetti, V., Breton, S., Faurie, J-M., Marchel, L., Obis, D., Oudot, E., Paquet, D., et Robinson, T., 2005. Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets probiotiques in : Luquet F-M et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. pp 30-51. Ed Lavoisier. Paris.

Poulain F (1994). Evolution de la préparation commerciale des ferments lactiques in : Les bactéries lactiques, T1, Aspects fondamentaux et technologiques. pp 604 Ed Loriga, Lavoisier.

Renner, E., 1994. Lactic acid bacteria in human nutrition in: Novel G et Le Querler J-F. Les bactéries lactiques. Actes du colloque Lactic 94 Caen 7-9 septembre 1994. Presses universitaires de Caen. France.

Références bibliographiques

Savado, A., et Traore, A.S., 2011. La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-20
International Journal of Biological and Chemical Sciences. Burkina Faso.

Schmidt, J., Tourneur, C., et Lenoir, J.,1994b. Fonction et choix des bactéries lactiques en technologies laitières . In *Bactéries lactiques : aspect fondamentaux et technologiques* .pp. 37-54. Edition by H. de Roissart et F. Luquet. Paris. France.

Shah Ali UL. Q., Lubna, I., Afsheen, A., Erum, S., et Abid, A., 2005. Production of Dextran by Newly Isolated Strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]*; 31 (1); 21–26.

Sobrino-Lopez, Martin-Belloso., 2007. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* 18 329–343.

Sumarsih.S, Sulistiyanto.B, et Sutrisno.C.L. (2012). Caractéristiques, Stabilité and Antimicrobial activity of lactic acid bacteria (*Leuconostoc* sp) isolated from broiler's caecum during storage. Faculty of Animal Agriculture, Diponegoro University.

Tailliez.P (2001). les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81 1–11 1. INRA, EDP Sciences. France.

Tantaoui-EL Araki, A., Berrada, M., EL Marrakchi, A., et Berramou, A., 1983. Etude sur le Lben marocain. *Lait* 63 230-245 . DOI: 10.1051/lait: 1983627-62816.

Vedamuthu, E.R., 1994. The dairy *Leuconostoc* - Use in dairy-products. *Journal of Dairy Sciences* 77: 2725-2737.

Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjmaa, B., Henni, J.E., et Kihal, M., 2012. Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature et Technologie*. Algérie.

Genome.jgi-psf.org kcms.daegu.ac.kr visualphotos.com

(<http://www.oocities.com/chezfr/photo/leuconostoc.jpg>).

Le logiciel GraphPadPrism 5 Demo. Inc. San Diego, USA.

Annexe 1 :

Tableau 7 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 02 pendant 24h d'incubation à 30°C.

Souche 02			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,36	3,70	17,5
2	6,32	3,80	19,0
4	6,29	3,90	19,5
6	6,26	4,20	21,0
8	6,08	4,50	21,5
24	5,75	4,70	23,75

Tableau 8 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 26 pendant 24h d'incubation à 30°C.

Souche 26			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,24	3,70	18,5
2	6,23	3,90	19,5
4	6,16	4,10	20,5
6	6,02	4,40	22,0
8	5,70	4,70	23,5
24	5,45	5,02	25,1

Tableau 9 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 36 pendant 24h d'incubation à 30°C.

Souche 36			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH)mL	Acidité en °D
0	6,24	3,70	18,5
2	6,18	3,80	19,0
4	6,13	4,12	20,6
6	6,08	4,30	21,0
8	5,80	4,60	23,0
24	5,55	5,02	25,1

Tableau10: Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 37 pendant 24h d'incubation à 30°C.

Souche 37			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,45	3,50	17,5
2	6,43	3,60	18,0
4	6,41	3,70	18,5
6	6,39	3,80	19,0
8	6,29	3,90	19,5
24	6,18	4,50	22,5

Tableau11: Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 38 pendant 24h d'incubation à 30⁰C.

Souche 38			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en ⁰D
0	6,34	3,60	18,0
2	6,31	3,80	19,0
4	6,28	4,90	19,5
6	6,24	4,20	21,0
8	6,06	4,30	21,5
24	5,65	4,70	23,5

Tableau12: Evolution du pH et de l'acide produit par la souche 65 pendant 24h d'incubation à 30⁰C

Souche 65			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en ⁰D
0	6,45	3,50	17,7
2	6,42	3,60	18,0
4	6,40	3,70	18,5
6	6,36	3,80	19,0
8	6,32	4,00	20,0
24	6,06	4,60	24,0

Tableau13: Evolution du pH et de l'acide produit par la souche105 pendant 24h d'incubation à 30°C

Souche 105			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,46	3,10	15,5
2	6,44	3,20	16,0
4	6,42	3,30	16,5
6	6,41	3,30	16,5
8	6,39	3,40	17,0
24	6,12	3,80	19,0

Tableau 14: Evolution du pH et de l'acide produit par la souche CIP 102422 pendant 24h d'incubation à 30 °C.

Souche CIP 102422			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,43	3,40	17,0
2	6,38	3,50	17,5
4	6,35	3,70	18,5
6	6,34	3,80	19,0
8	6,31	3,90	19,5
24	6,10	4,30	21,5

Tableau 15 : Evolution du pH et de l'acide produit par la souche **CNRZ 77^T** pendant 24h d'incubation à 30 °C.

Souche CNRZ 77^T			
Temps (heures)	pH	Volume (NaOH) mL	Acidité en °D
0	6,66	3,00	15,0
2	6,60	3,20	16,0
4	6,52	3,30	16,5
6	6,46	3,50	17,5
8	6,42	3,70	18,5
24	6,21	4,30	21,5

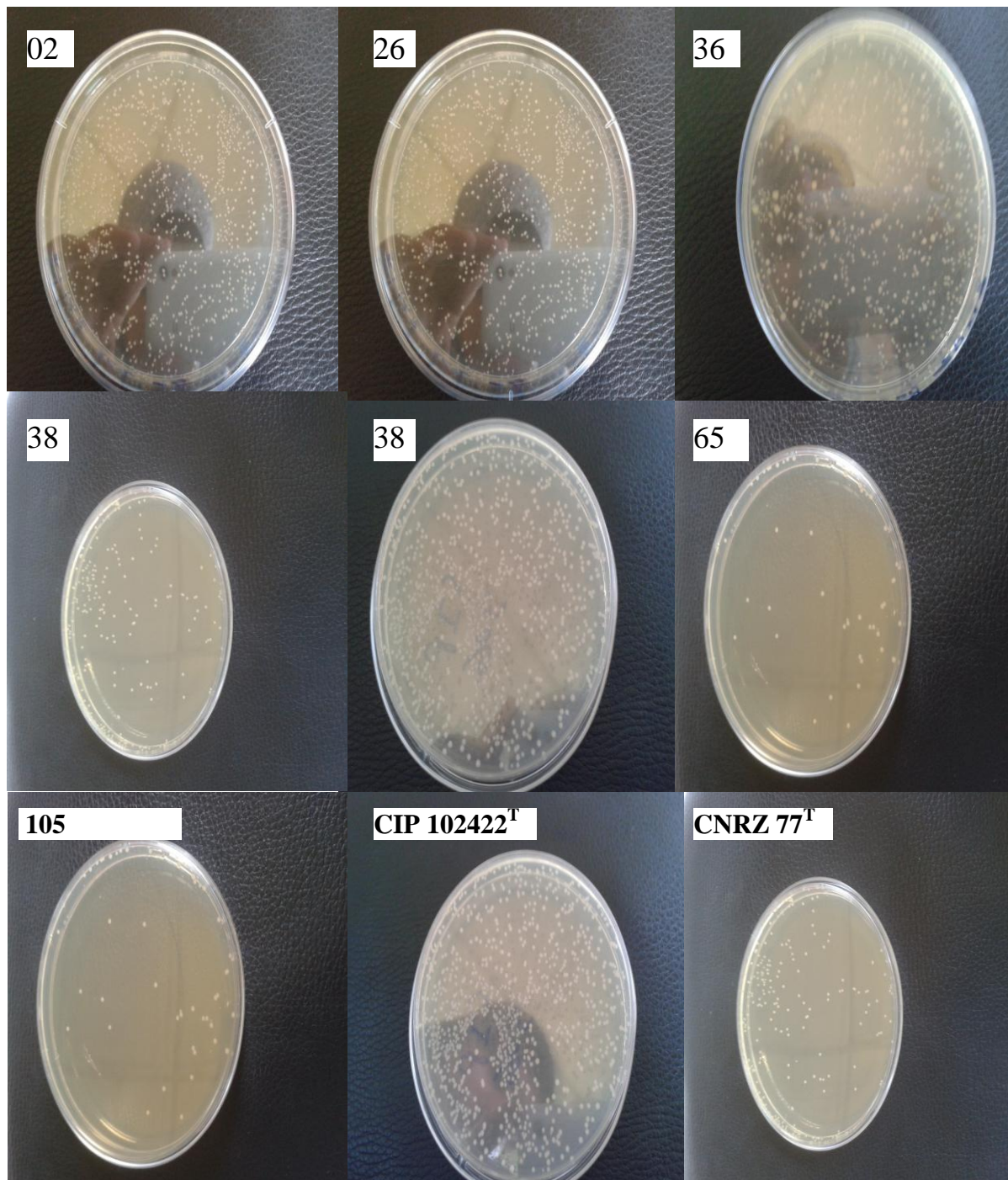


Figure18 : Colonies des neuf souches sur MRS solide après 24h d'incubations à 30 °C.

Annexe 2 : Composition des milieux de cultures

➤ M.R.S (Man Rogosa et Sharpe, 1960) gélose

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
Extrait de viande	10
Extrait de levure.....	5
Peptone	10
Acétate de sodium.....	5
Citrate de sodium	2
Glucose	20
MgSO4.....	0,25
MnSO4	0,05
KH ₂ PO ₄	2
Agar-agar	15
Tween 80	1 mL
Eau distillée q.s.p...1000 mL	

pH= 6,8

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn.

➤ **M.R.S (Man Rogosa et Sharpe, 1960) bouillon**

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Peptone	10
Acétate de sodium	5
Citrate de sodium	2
Glucose	20
MgSO ₄	0,25
MnSO ₄	0,05
KH ₂ PO ₄	2
Tween 80	1 mL
Eau distillée q.s.p.....	1000 mL

pH= 6,8

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn.

➤ **Diluant**

Eau peptonnée

Ingrédients	Quantités en grammes
Peptone	1
Chlorure de sodium	8,5
Eau distillée q.s.p.....	1000 mL

pH=7,5

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

Résumé

L'étude du pouvoir acidifiant des neuf souches appartenant au genre *Leuconostoc*, ensemencé dans du lait écrémé reconstitué, a permis de mesurer le pH et l'acide produit en °D toute les deux heures pendant 24h. Le suivi de la cinétique d'acidification de chaque souche a montré que les souches de *Leuconostoc mesenteroides spp* (26 et 36) ont une capacité acidifiante importante (soit une acidité ≥ 23 °D) correspondant à une DO et un taux d'UFC/mL à t=0h important, contrairement aux espèces : *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (105), *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* (65), et *Leuconostoc lactis* (CIP 102422) (soit une acidité ≤ 23 °D). Mais les valeurs maximales obtenus après 24 heures d'incubation à 30°C nous ont permis de conclure que nos souches testées de leuconostoc sont en général faiblement acidifiantes, en effet le genre *Leuconostoc* en technologie laitière est utilisé pour son pouvoir aromatisant et pour la production du CO₂ alors que la production d'acide est préconisé pour les Lactocoques.

Mots clés : pouvoir acidifiant, *Leuconostoc*, lait reconstitué, pH, acide

Abstract

The study of acidifying ability of nine strains belonging to the genus *Leuconostoc*, inoculated in skim reconstituted milk, allowed us to measure pH and the produced acid (in °D) every 2 hours for 24h. The following of acidification kinetics for each strain has shown that *Leuconostoc mesenteroides spp* (26 et 36). Have an important acidifying ability (with acidity ≥ 23 °D) corresponding to important OD and UFC/mL rate at t=0h, in contrast to *leuconostoc mesenteroides. subsp mesenteroides* (105), *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum* (65) and *Leuconostoc lactis* (CIP 102422) (with acidity ≤ 23 °D). However, the maximal values obtained after 24 hours of incubation at 30°C allowed us to conclude that the tested strains of *Leuconostoc* are generally weakly acidifying. in fact, the genus *Leuconostoc* is used in dairy technologies for their flavoring ability and production of CO₂, while the production of acid is confined for Lactocoques.

Key words: acidifying ability, *Leuconostoc*, reconstituted milk, pH, acid.

المخلص

سمحت لنا دراسة قدرة التخمير لتسع سلالات تابعة لنوع *Leuconostoc* المستنبطة في الحليب خالي الدسم و المعاد تشكيله بقياس الأساس الهيدروجيني و الحمض المنتج بوحدة °D و هذا كل ساعتين لمدة 24 ساعة. أظهرت متابعة تطور درجة التخمير لكل سلالة بأن السلالات *Leuconostoc mesenteroides spp* (26 et 36) لديها قدرة تخمير مهمة (مع درجة حموضة ≤ 23 °D) متوافقة مع كثافة ضوئية و نسبة UFC/mL عالية عند بداية التجربة. و هذا على عكس السلالات *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* (105), *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum* (65) و *Leuconostoc lactis* (CIP 102422) (أي درجة حموضة ≥ 23 °D) ولكن القيم القصوى المتحصل عليها بعد 24 ساعة من التحضين تحت درجة حرارة 30 °C سمحت لنا باستنتاج بأن السلالات المختبرة هي عموما ضعيفة التخمير، حيث يستعمل نوع *Leuconostoc* في تكنولوجيا الحليب لقدرته على إنتاج العطر النكهة و إنتاج غاز CO₂ فيما يقتصر إنتاج الأحماض على نوع Lactocoques.

الكلمات المفتاحية: قدرة التخمير، *Leuconostoc*، الحليب المعاد تشكيله، الأس الهيدروجيني، الحمض.