

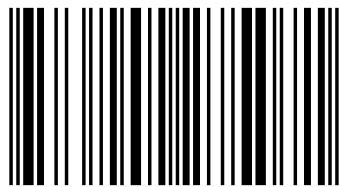


Dans l'optique de contribuer à la diversification de la gamme des produits probiotiques limités jusqu'ici aux matrices laitières et de valoriser les matières premières locales, nous nous sommes fixés pour objectif de trouver les conditions de fermentation de la sève fraîche de *Rafia farinifera* par deux ferments probiotiques à savoir *L.fermentum* et *B.bifidum*. Nous avons dans un premier temps caractérisé la sève de raphia sur le plan physicochimique et étudié les aptitudes des ferments ainsi que leur viabilité dans ladite sève. Les caractéristiques physicochimiques de la sève et la viabilité des ferments dans cette dernière ont montré la faisabilité de ce travail. Par ailleurs, l'optimisation des paramètres physicochimiques grâce au modèle de Box-Behnken a conduit aux conditions opératoires suivantes : des taux d'ensemencement de *B.bifidum* et *L.fermentum* respectifs de 10% et 2,82% , une température d'incubation de 37 °C et un temps d'incubation de 14H2 min. Ainsi, ces conditions ont permis d'obtenir une boisson ayant une acidité titrable de 8 g d'acide lactique/L, un pH de 3,87, une teneur en protéines de 574,6(mg/L), un Brix de 5,47 et une quantité de probiotiques de $1,13E+8$ UFC.

Joseph Arsène MBARGA MANGA, Ingénieur de Travaux en Analyses Biologiques et Biochimiques, Institut Universitaire de Technologies de l'Université de Ngaoundéré, né le 28 janvier 1997 à Nlobison II, Yaoundé, Cameroun.

Joseph Arsene Mbarga Manga
Léopold Ngouné Tatsadjieu
Steve Carly Zangué Desobgo

Production d'une boisson probiotique à base de sève de Raphia



978-620-2-27507-1

**Joseph Arsene Mbarga Manga
Léopold Ngouné Tatsadjieu
Steve Carly Zangué Desobgo**

Production d'une boisson probiotique à base de sève de Raphia

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**Joseph Arsene Mbarga Manga
Léopold Ngouné Tatsadjieu
Steve Carly Zangué Desobgo**

**Production d'une boisson
probiotique à base de sève de Raphia**

FOR AUTHOR USE ONLY

Éditions universitaires européennes

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

Éditions universitaires européennes

is a trademark of

International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius

Printed at: see last page

ISBN: 978-620-2-27507-1

Copyright © Joseph Arsene Mbarga Manga, Léopold Ngouné Tatsadjieu, Steve Carly Zangué Desobgo

Copyright © 2018 International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

All rights reserved. Beau Bassin 2018

FOR AUTHOR USE ONLY



- ✚ A mes parents : Mr MANGA YOMO et Mme MBITOU MOU Marie
- ✚ A mon frère aîné : Mr MANGA Joseph Romuald
- ✚ A ma tante : Mme ADAMO U Née ONGONO Marceline

FOR AUTHOR USE ONLY



REMERCIEMENTS

Nous ne saurions achever ce travail sans remercier toutes les personnes par leur franc et précieux soutien moral, matériel et financier, qui nous ont aidées pour sa réalisation.

Il s'agit de :

- ✚ **Pr ALI AHMED**, Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Ngaoundéré, pour toutes les dispositions qu'il a prises pour assurer notre formation;
- ✚ **Pr NSO Emmanuel**, Directeur de l'Ecole National Supérieur des Sciences Agro-alimentaires (ENSAI) pour nous avoir permis d'accéder au laboratoire de Génie Et Technologie Alimentaire (GETA).
- ✚ **Mes encadreurs Pr TATSADJEU Léopold et Dr DESOBGO Steve Carly**, pour leur disponibilité et leurs multiples conseils ;
- ✚ **Mr EKORONG Junior**, pour l'encadrement, le soutien permanent et les multiples conseils qui ont permis de mieux apprécier et d'achever ce travail ;
- ✚ **Mr BEUMO et Mr NODEM**, pour les multiples conseils et leur aide très précieuse au laboratoire de microbiologie ;
- ✚ **Mme NGUEMOGNE Annick**, pour sa présence permanente au laboratoire et son aide précieuse ;
- ✚ **Mr MAHAMAT**, pour les multiples encouragements et son aide ;
- ✚ **Tous les doctorants et masters du laboratoire GETA** pour leurs conseils et leur disponibilité ;
- ✚ **M. MENGUE** chef de Service de la Formation Permanente et des Relations avec les Milieux Professionnels de l'IUT de Ngaoundéré, pour ses conseils, le soutien moral et les encouragements ;
- ✚ **Tout le Corps enseignant** de la filière Génie Biologique de l'IUT de Ngaoundéré, pour les moyens mis en œuvre pour assurer notre formation ;
- ✚ **Mme ADAMOU** pour le soutien inconditionnel ;
- ✚ **Dr. BOMBA Denis et son épouse** pour l'accueil chaleureux et le soutien inconditionnel ;
- ✚ **A ma famille toute entière** pour le soutien et les encouragements.

Table des matières

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des annexes.....	x
Liste des abréviations	xi
Partie 1 : PRESENTATION DE L'ENTREPRISE.....	xii
I-HISTORIQUE ET ADRESSE COMPLETE.....	xii
I-1-Historique.....	xii
I-2-Situation géographique et adresse complète.....	xii
I-3-Secteurs d'activités.....	xii
I-4-Organigramme de l'IUT.....	xiv
RESUME.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCTION.....	3
PARTIE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
I-LES PROBIOTIQUES.....	6
I-1 Historique et définitions.....	6
I-1-1 Historique.....	6
I-1-2 Définitions.....	6
I-2 Les principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique.....	7
I-2-1 Bifidobacterium.....	8
I-2-2 Lactobacillus	10
I-3- Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	12
I-4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	15
I-5. Mécanisme d'action des probiotiques.....	15

I-6. Applications des probiotiques	16
I-7 Combinaisons de probiotiques	16
I-8 Incorporation des probiotiques dans les aliments	17
I-8-1 Quantité de probiotiques	17
I-8-2 Conservation des concentrés de probiotiques	18
I-8-3 Préparation des souches	20
I-8-4 Nature physico-chimique de l'aliment probiotique	20
II- Le <i>Raphia</i> (<i>Raphia farinifera</i>) (Gaertn.) Hyl.,1952)	21
II-1 Origine et distribution géographique <i>Raphia farinifera</i>	21
II-2 Description de <i>Raphia farinifera</i>	21
II-3 Utilisations de <i>Raphia farinifera</i>	23
II-4 Production et Utilisations de la sève de <i>Raphia farinifera</i>	23
II-4-1 Extraction et utilisation de la sève	23
III-Les plans d'expérience	23
III-1 Notions utilisées aux plans d'expériences	24
III-1 -1 Espace expérimental	24
III-1 -2 Surface de réponse	24
III-2 Notion de modélisation mathématique	25
III-2-1 Equation mathématique	25
III-2-2. Erreur	25
III-2-3 p-value	26
III-2-4 Coefficient de détermination R^2	26
III-3 Types de plans d'expériences	26
III-3-1 Les plans pour surface de réponse	27
III-3-1-1 Le modèle Box-Behnken	27
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	28
II-1 Matériel	29

II-1-1 La sève de Raphia	29
II-1-2 Les ferments.....	29
II-1-3 Les antibiotiques	30
II-1-4 Les souches indicatrices.....	30
II-1-5 Les milieux de culture.....	30
II-1-7 Appareillages	30
II-2 Méthodes.....	30
II-2-1 Obtention et stérilisation de la sève de raphia.....	30
II-2-2 Caractérisation physicochimique de la sève de raphia	30
II-2-2-1 Teneur en eau et en matière sèche	31
II-2-2-2 teneur en cendres.....	31
II-2-2-3 Détermination de la masse volumique.....	32
II-2-2-4 Détermination du °Brix.....	32
II-2-2-5 Détermination du pH.....	32
II-2-2-6 Dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (Lowry et al,1951)	32
II-2-2-7 Détermination de la teneur en sucres par la méthode au DNS.....	33
II-2-2-8 Détermination de l'acidité titrable	34
II-2-2-9 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux	35
II-2-3 Préparation des ferments.....	36
II-2-3-1 Revivification et multiplication des souches	36
II-2-3-2 Détermination de la concentration cellulaire des multiplicats.....	37
II-2-3-3 Viabilité et courbe de croissance des ferments sur sève de raphia	37
II-2-4 Aptitudes des ferments.....	37
II-2-4-1 Aptitude acidifiante.....	37
II-2-4-2 Résistance aux antibiotiques	37
II-2-4-3 Aptitudes antagonistes	37

II-2-5 procédé de production de la boisson probiotique	38
II-2-6-Modélisation	39
II-2-7 Optimisation.....	41
II-2-7 Analyse sensorielle	41
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	42
III-1 Caractéristiques physicochimiques de la sève de raphia.....	42
III-2 Courbe de croissance et viabilité des ferments sur sève de Raphia	44
III-3 Aptitudes des ferments	46
III-3-1 Résistance aux antibiotiques	46
III-3-2 Aptitude acidifiante	47
III-4 Modélisation de l'impact des facteurs (taux d'ensemencement ; température et temps d'incubation) sur les paramètres physicochimiques de la boisson probiotique.....	48
III-4-1 Modélisation de la teneur en sucres réducteurs.....	49
III-4-2 Modélisation du Brix	53
III-4-3 Modélisation des protéines solubles.....	59
III-4-4 Modélisation du pH.....	65
III-4-5 Modélisation de l'acidité lactique	70
III-5 Modélisation de l'impact des facteurs (taux d'ensemencement ; température et temps d'incubation) sur les paramètres microbiologiques de la boisson probiotique.	76
III-5-1 Modélisation de la charge en probiotiques.....	77
III-5-2 Modélisation des diamètres d'inhibition des souches indicatrices.....	80
III-6 Optimisation des paramètres physicochimiques et microbiologiques de la boisson probiotique.....	82
III-7 Résultats de l'analyse sensorielle	84
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
ANNEXES	96

Liste des figures

Figure 1: Organigramme de l'IUT de Ngaoundéré.....	vi
Figure 2: Photo de <i>Raphia farinifera</i> (Gaertn.,1952)	22
Figure 3: Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).....	24
Figure 4: Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).	24
Figure 5: Schéma synoptique du travail effectué	28
Figure 6: Photo des bocal de sève de raphia.....	29
Figure 7: Photos des emballages des deux ferments lyophilisés.....	29
Figure 8: Equation de la réaction de réduction du DNS lors du dosage des sucres réducteurs	34
Figure 9: Procédé de production de la boisson probiotique de sève de <i>Raphia</i> lactofermentée.	38
Figure 10: Viabilité et courbe de croissance de <i>L.fermentum</i> sur sève de <i>Raphia</i>	45
Figure 11: Viabilité et courbe de croissance de <i>B.bifidum</i> sur sève de <i>Raphia</i>	45
Figure 12: Evolution de l'acidité de la sève fermentée à <i>B.bifidum</i> (5%).....	47
Figure 13: Evolution de l'acidité de la sève fermentée à <i>L.fermentum</i> (5%)	47
Figure 14: Evolution du pH de la sève fermentée à <i>B.bifidum</i> (5%).....	47
Figure 15: Evolution du pH de la sève fermentée à <i>L.fermentum</i> (5%)	47
Figure 16: Effet du taux d'ensemencement de <i>Bifidobacterium</i> sur la teneur en sucres.....	50
Figure 17: Effet du taux d'ensemencement de <i>Lactobacillus</i> sur la teneur en sucres	51
Figure 18: Effet du temps d'incubation sur la teneur en sucres.....	52
Figure 19: Effet du taux d'ensemencement de <i>Bifidobacterium</i> sur le Brix	54
Figure 20: Effet du taux d'ensemencement de <i>Lactobacillus</i> sur le Brix	55
Figure 21: Effet du temps d'incubation sur le Brix	56
Figure 22: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de <i>Bifidobacterium</i> et de <i>Lactobacillus</i> sur le Brix	57
Figure 23: Influence de l'interaction entre le taux d'ensemencement de <i>Bifidobacterium</i> et le temps d'incubation sur le Brix.	58
Figure 24: Effet du taux d'ensemencement de <i>Bifidobacterium</i> sur la teneur en protéines solubles.....	60
Figure 25: Effet du taux d'ensemencement de <i>Lactobacillus</i> sur la teneur en protéines.....	61
Figure 26: Effet du temps d'incubation sur la teneur en protéines	62

Figure 27: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur la teneur en protéines	63
Figure 28: Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement de Bifidobacterium et la température d'incubation sur la teneur en protéines	64
Figure 29: Effet du taux d'ensemencement de Bifidobacterium sur le pH.....	66
Figure 30: Effet du taux d'ensemencement de Lactobacillus sur le pH	67
Figure 31: Effet du temps d'incubation sur le pH.....	68
Figure 32: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur le pH.....	69
Figure 33: Effet du taux d'ensemencement de B.bifidum sur l'acidité.....	71
Figure 34: Effet du taux d'ensemencement de Lactobacillus sur l'acidité	72
Figure 35: Effet du temps d'incubation sur l'acidité.....	73
Figure 36: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur l'acidité	74
Figure 37: Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement de Bifidobacterium et le temps d'incubation sur l'acidité	75
Figure 38: Influence du taux d'ensemencement de Lactobacillus sur la quantité de probiotiques	78
Figure 39: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur la quantité de probiotiques.....	79
Figure 40: Résultats de l'analyse sensorielle	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Adresse complète de l'Institut de Ngaoundéré.....	xii
Tableau 2: Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Shah, 2007).	7
Tableau 3: Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques .	12
Tableau 4: Les principaux effets bénéfiques attribués aux	15
Tableau 5: Intervalles de variation de chaque facteur	40
Tableau 6: Caractéristiques physicochimiques de la sève de Raphia	42
Tableau 7: Diamètres d'inhibition de la résistance des ferments aux antibiotiques	46
Tableau 8: Résultats des analyses physicochimiques	48
Tableau 9: Analyse de variance pour le suivi de la teneur en sucres réducteurs	49
Tableau 10:Analyse de variance pour le suivi du Brix	53
Tableau 11:Analyse de variance pour le suivi de la teneur en protéines solubles	59
Tableau 12::Analyse de variance pour le suivi du pH	65
Tableau 13: Analyse de variance pour le suivi de l'acidité lactique.....	70
Tableau 14:Résultats moyens des analyses microbiologiques des boissons probiotiques.....	76
Tableau 15:Analyse de variance pour le suivi de la charge en probiotiques	77
Tableau 16:Résumé des paramètres de validation des modèles du suivi des diamètres d'inhibition.....	80
Tableau 17: Analyse de la variance pour le suivi des diamètres d'inhibition des souches indicatrices	81
Tableau 18 : Valeurs des caractéristiques optimales de la boisson probiotique	83
Tableau 19:Résultats de l'analyse sensorielle.	84

Liste des annexes

Annexe 1: Courbe d'étalonnage des sucres 96

Annexe 2: Courbe d'étalonnage des polyphénols. 97

Annexe 3: Courbe d'étalonnage des protéines solubles 97

Annexe 4: Etalonnage et procédure de dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS. 98

Annexe 5: Etalonnage et procédure de dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry
..... 98

Annexe 6: Plan d'expérience de Box- Behnken à 04 facteurs. 99

Annexe 7: Fiche d'analyse sensorielle de la boisson probiotique 100

FOR AUTHOR USE ONLY

Liste des abréviations

ABB: Analyses Biologiques et Biochimiques

Bif : *Bifidobacterium bifidum*

SAB : Sérum Albumine Bovin.

DNS : Acide 3, 5 dinitrosalicylique

DO : Densité Optique

DUT: Diplôme Universitaire de Technologie

ENSIAAC: Ecole Nationale Supérieure d'Industries Agro-alimentaires du Cameroun

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Organisations des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

GEN: Génie de l'Environnement

GETA: Génie Et Technologie Alimentaire

GRAS : Generally Regarded As Safe

I.U.T: Institut Universitaire de Technologie

IAB: Industries Alimentaires et Biotechnologiques

LAB : Bactéries lactiques

Lac : *Lactobacillus fermentum*

MS : Matière Sèche

pH : Potentiel d'Hydrogène

SD : Solution Saline de Dilution

Partie 1 : PRESENTATION DE L'ENTREPRISE

I-HISTORIQUE ET ADRESSE COMPLETE

I-1-Historique.

L'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Ngaoundéré est né de l'ENSIAAC (Ecole National Supérieure des Industries Agroalimentaires du Cameroun). Cette dernière fut créée en 1977 et ouverte en 1982 dans le cadre du centre universitaire de Ngaoundéré. Elle était constituée de trois cycles de formation : le cycle technicien, le cycle des ingénieurs de travaux et le cycle des ingénieurs de conception.

Lors des reformes dans l'enseignement supérieure au Cameroun, par décret n° 010/CAB/PR 19 janvier 1993, L'ENSIAAC s'éclate en deux établissements à savoir L'ENSAI (Ecole Nationale des Sciences Agro-industrielles) et l'IUT (Institut Universitaire de Technologie). Cette dernière forme des techniciens et des ingénieurs de travaux alors que la précédente hérite de la formation des ingénieurs de conception

I-2-Situation géographique et adresse complète.

L'IUT de Ngaoundéré est placé sous la tutelle académique et administrative de l'Université de Ngaoundéré située à Dang, à quinze kilomètre du centre-ville sur la route nationale N°1.

Le tableau 1 présente l'adresse complète de l'iut de Ngaoundere (boite postale, numéro de téléphone et adresse Email).

Tableau 1 : Adresse complète de l'iut de Ngaoundéré.

Boite postale	455 Ngaoundéré
Téléphone	(237)6 77 11 22 28 /6 77 11 22 20
Email	iutngaoundéré@yahoo.fr

I-3-Secteurs d'activités.

Vouée à une formation post scolaire et universitaire à caractère professionnel et technologique dans les domaines des techniques industrielles, de l'informatique et du génie des procédés, l'IUT a pour mission de :

- Dispenser en formation initiale, un enseignement moyen supérieur préparant aux fonctions de Techniciens Supérieurs dans les domaines des techniques industrielles, du génie des procédés, et de l'informatique ;
- Assurer la formation permanente dans les mêmes domaines qu'en formation initiale;
- Former des Cadres Techniques moyens capables d'intervenir et de faire fonctionner tous les départements industriels ;
- Fournir aux entreprises ou administrations, des prestations de recherche appliquée, de service ou de formation professionnelle dans les domaines techniques correspondants à leurs activités.

L'IUT de Ngaoundéré dispose de 2 cycles de formations :

- Le premier cycle d'une durée de 4 semestres préparant au diplôme universitaire de technologie (DUT) ;
- Le second cycle d'une durée de 2 semestres préparant au diplôme de licence professionnelle.

La formation à L'IUT vise trois objectifs fondamentaux :

- Développer et transférer des savoirs, des savoir-faire, des compétences techniques, technologiques et professionnels de haut niveau dans la spécialité choisie ;
- Promouvoir la polyvalence et l'adaptation face au contexte et à l'évolution rapide des sciences et techniques ;
- Développer et favoriser l'esprit d'initiative, l'esprit d'entreprise, le travail de groupe, la recherche de l'auto emploi.

L'IUT compte trois mentions différentes, comprenant chacune plusieurs parcours à savoir:

- ❖ La mention Génie Biologique qui propose une formation dans les différents domaines de la production pour les secteurs agroalimentaires et biologiques (parcours Industrie Alimentaire et Biotechnologique (IAB), du laboratoire des industries agroalimentaires et autres activités (parcours Analyse Biologique et Biochimique (ABB), et dans les différents domaines de technologie de mesure, d'analyse, de traitement des polluants et de la gestion des déchets (parcours Génie de l'Environnement (GEN) ;

- ❖ La mention Génie Informatique qui forme les Techniciens dans le domaine de l'informatique notamment de la programmation (parcours Génie Logiciel), des réseaux informatiques (parcours Systèmes et Réseaux) ;
- ❖ La mention Génie Industrielle et Maintenance qui forme les Techniciens Supérieurs polyvalents orientés vers l'électronique, l'électrotechnique, l'automatique, la mécanique (parcours Maintenance Industrielle et Productive (MIP et GMP), mais aussi vers l'énergétique et la thermique industrielle (parcours Génie Thermique et Energétique (GTE et GEL).

I-4-Organigramme de l'IUT.

FOR AUTHOR USE ONLY

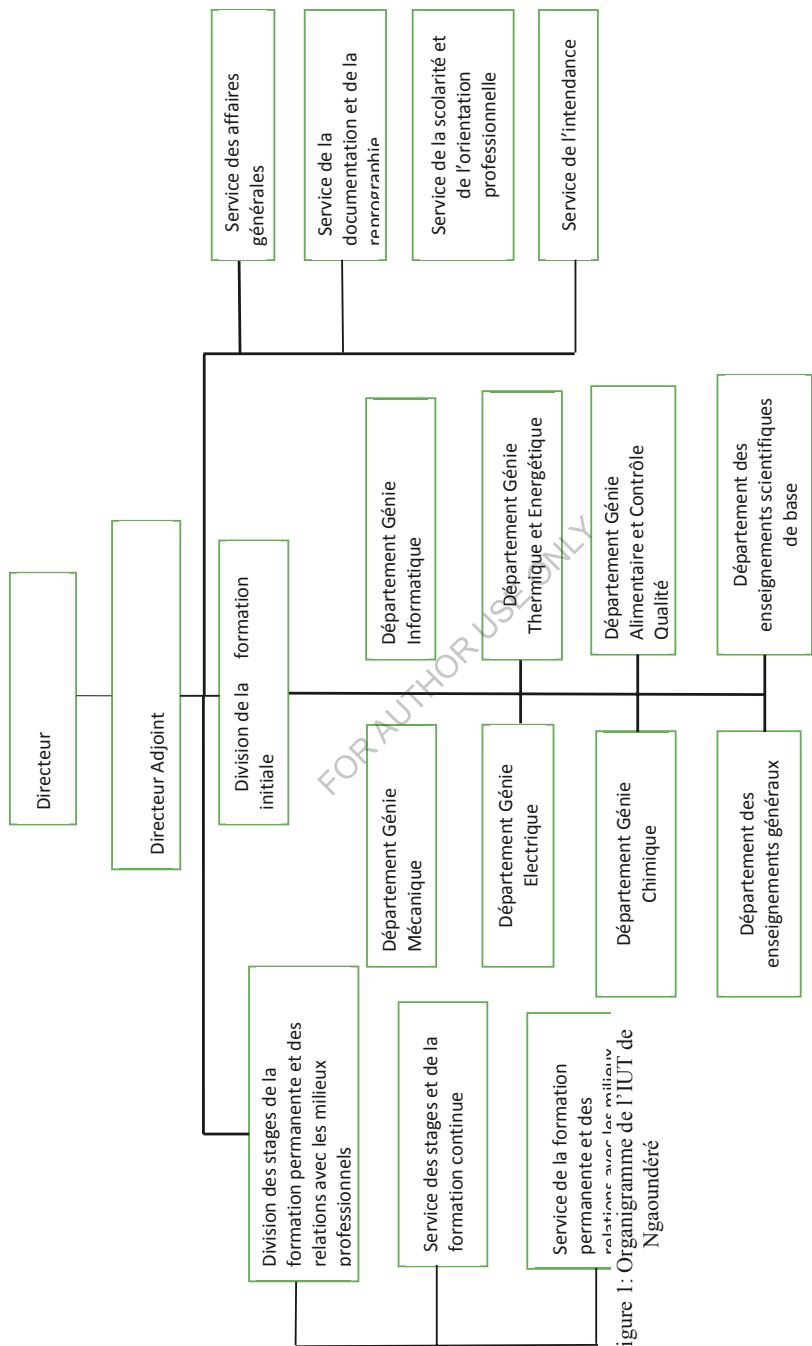


Figure 1: Organigramme de l'IUT de Ngaoundéré

RESUME

Dans l'optique de contribuer à la diversification de la gamme des produits probiotiques limités jusqu'ici aux matrices laitières et de valoriser les matières premières locales, nous nous sommes fixés pour objectif de trouver les conditions de fermentation de la sève fraîche de *Rafia farinifera* par deux ferments probiotiques à savoir *L. fermentum* et *B. bifidum*. Nous avons dans un premier temps caractérisé la sève de raphia sur le plan physicochimique et étudié les aptitudes des ferments ainsi que leur viabilité dans ladite sève. Les caractéristiques physicochimiques de la sève ($3,801 \% \pm 0,037$ de matière sèche, $7,044 \pm 0,172$ g de cendres par 100 g de matière sèche, $10,789 \pm 1,388$ g de sucres réducteurs par litre, acidité titrable de 4,44 équivalent gramme d'acide lactique par litre, pH de 4,12, $2,91 \pm 0,94$ g de composés phénoliques totaux par litre, masse volumique de 1,158 g/L et un Brix de 4,2) et la viabilité des ferments dans cette dernière ont montré la faisabilité de ce travail. Par ailleurs, l'optimisation des paramètres physicochimiques grâce au modèle de Box-Behnken après avoir maximisé le Brix, les sucres réducteurs et les protéines et fixé le pH à 4, l'acidité lactique à 9 g/L, la quantité de probiotiques à $1,00 \text{ E}+10$ UFC/mL, ainsi que les diamètres d'inhibition à 14 mm pour *Salmonella* et 12 mm pour les 3 autres souches testées (*L.monocytogenes*, *E.coli* et *B.cereus*) a conduit aux conditions opératoires suivantes : des taux d'ensemencement de *B.bifidum* et *L.fermentum* respectifs de 10 % et 2,82 %, une température d'incubation de 37 °C et un temps d'incubation de 14 H 2 min. Ainsi, ces conditions ont permis d'obtenir une boisson ayant une acidité titrable de 8 g d'acide lactique/L, un pH de 3,87, une teneur en protéines de 574,6 (mg/L), un Brix de 5,47 et une quantité de probiotiques de $1,13 \text{ E}+8$ UFC/mL. Au-delà de cette optimisation, une analyse sensorielle réalisée sur le produit optimisé a montré que celui-ci était acceptable sur le plan organoleptique.

Mots clés : Probiotiques, Boissons, sève de raphia, fermentation.

ABSTRACT

In order to contribute to the diversification of the range of probiotic products limited until now to the dairy matrices and to valorize the local raw materials, we set ourselves the objective of finding the conditions of fermentation of the fresh sap of *Raffia farinifera* by two probiotic ferments namely *L. fermentum* and *B. bifidum*. We first characterized raffia sap physicochemically and studied the ability of ferments and their viability in the sap. The physicochemical characteristics of the sap ($3.801\% \pm 0.037$ dry matter, 7.044 ± 0.172 g of ash per 100 g of dry matter, 10.789 ± 1.388 g of reducing sugars per liter, titratable acidity of 4.44 equivalent grams of lactic acid per liter, pH of 4.12, 2.91 ± 0.94 g of total phenol compounds per liter, density of 1.158 g / L and a Brix of 4.2) and the viability of the ferments in the latter showed the feasibility of this work. Moreover, the optimization of physicochemical parameters thanks to the Box-Behnken model after maximizing Brix, reducing sugars and proteins and setting the pH at 4, lactic acidity at 9 g / L, the amount of probiotics at $1,00 \text{ E}+10\text{CFU} / \text{mL}$, as well as the inhibition diameters at 14 mm for *Salmonella sp* and 12 mm for the other 3 strains tested (*L. monocytogenes*, *E. coli* and *B.cereus*) led to the following operating conditions: *B.bifidum* and *L. fermentum* seeding rates of 10% and 2.82% respectively, an incubation temperature of 37°C and an incubation time of 14 H 2 min. Thus, these conditions made it possible to obtain a drink having a titratable acidity of 8 g of lactic acid / L, a pH of 3.87, a protein content of 574.6 (mg / L), a Brix of 5 ,47 and an amount of probiotics of $1.13 \text{ E} + 8 \text{ CFU} / \text{mL}$. Beyond this optimization, a sensory analyse performed on the optimized product showed that it was organoleptically acceptable.

Key words: Probiotics, Beverages, raffia sap, fermentation.

INTRODUCTION

Les propriétés bénéfiques sur la santé et la longévité résultant de la consommation de lait fermenté sont connues depuis des millénaires (Schrezenmeir et de Vrese, 2001). Cependant, en dépit de la réactualisation de l'idée au début du 21^e siècle par Metchnikoff, lauréat d'un prix nobel, qui soutenait la possibilité de remplacer les germes dangereux par des germes utiles (Heller, 2001), et malgré les travaux de Tissier, vers la même période, recommandant l'emploi de *Bifidobacterium* pour lutter contre la diarrhée infantile (Schrezenmeir et de Vrese, 2001), l'impact positif sur la santé de l'ingestion par l'alimentation de certaines bactéries fut longtemps ignoré. Ce n'est qu'à la fin du 20^e siècle que l'intérêt nécessaire à la reconnaissance de ces microorganismes, les probiotiques, comme agents de santé importants, fut renouvelé par la caractérisation de cultures probiotiques spécifiques et par la démonstration scientifique de leur influence positive sur la santé (FAO/OMS, 2001).

Tiré du grec et signifiant « en faveur (pro) de la vie (bios) », le mot probiotique apparaît pour la première fois dans la littérature scientifique en 1953 sous la plume de Kollath, et réfère alors aux composés alimentaires associés aux processus vitaux du corps (Azizpour et al., 2009). C'est en 1965 que le mot probiotique est pour la première fois associé aux microorganismes, dans un article de Lilly et Stillwell qui le définissent alors comme « une substance sécrétée par un microorganisme et stimulant la croissance d'un autre ». La définition évoluera ensuite largement pour finalement atteindre un consensus au sein des experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui définirent les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'administrés en quantité suffisante, confèrent des avantages bénéfiques à l'hôte » (FAO/OMS, 2001). C'est cette définition consensuelle qui est aujourd'hui la plus reconnue et qui est relayée par plusieurs associations telles que l'Organisation Mondiale de Gastroentérologie (World Gastroenterology Organisation, 2008).

De nombreuses souches microbiennes ont depuis révélé leur potentiel probiotique et des études cliniques menées sur des patients humains ont permis de démontrer l'efficacité de certaines d'entre elles dans la prévention ou l'atténuation de plusieurs désordres de santé. Plusieurs de ces recherches ont toutefois été effectuées sur un nombre limité de sujets ou présentaient des résultats mitigés et demanderaient, afin d'en confirmer les résultats, des investigations plus poussées. Le consensus entourant les probiotiques reste toutefois positif (Reid et Hammond, 2005; Sullivan et Nord, 2005).

Le marché des probiotiques est en continuelle expansion et présente d'importants intérêts économiques. Effectivement, au cours de la dernière décennie une augmentation constante des demandes de produits enrichis en probiotiques a été constatée aux États-Unis, au Japon et en Europe où des accroissements de consommation allant jusqu'à 150 % ont été enregistrés (Stanton et al., 2001). Le marché des probiotiques équivaut actuellement à 10 % du marché des aliments fonctionnels (Champagne et al., 2011), et une croissance de 25 % est observée aux États-Unis et en Europe de l'Est, alors qu'une augmentation respective de 5 et de 8 % est notée pour les marchés plus matures d'Asie et d'Europe de l'Ouest (Heller, 2009). Des prédictions laissent croire en 2012 que le marché des probiotiques vaudra à lui seul 28,8 milliards de dollars dès 2015, et ce dans un marché toujours immature et en croissance (Starling, 2010). Bien que les produits laitiers soient actuellement les principaux fournisseurs de probiotiques (Heller, 2001), de plus en plus de produits non laitiers contenant des probiotiques sont développés. Le marché se diversifie et l'on y voit entrer, entre autres, des céréales, des tablettes de chocolat, des biscuits, des barres tendres et des jus enrichis aux probiotiques (USProbiotic, 2006). L'importance grandissante accordée à une alimentation saine et bénéfique ainsi que le regard favorable que porte le public aux effets positifs des « bonnes bactéries », conjugués à l'apparition de nouveaux produits, expliquent l'augmentation de la consommation d'aliments probiotiques et la bonne santé financière du secteur (Starling, 2010). Conscient des bienfaits des probiotiques, le consommateur est d'ailleurs enclin à déboursier davantage pour leur acquisition (Starling, 2010).

Malgré sa diversification croissante, le marché des probiotiques apparaît toujours trop limité pour assurer la consommation suffisante de probiotiques nécessaire à l'obtention des effets bénéfiques qu'ils confèrent (Sanders, 2007). Il reste de plus principalement limité aux produits laitiers ce qui rend les probiotiques peu accessibles aux faibles consommateurs de cette gamme de produits (Heller, 2001). Effectivement, les habitudes, les goûts alimentaires et les comportements - comme l'émergence de plus en plus importante en Occident du végétarisme et du végétalisme - éloignent les consommateurs des produits probiotiques majoritairement d'origine laitière (Prado et al., 2008). Au-delà des habitudes alimentaires, entre 70 et 75 % de la population mondiale est limitée dans son accès aux probiotiques laitiers en raison d'intolérance au lactose (Kolida et al., 2006). Aux États-Unis, cette statistique varie selon les ethnies entre 15 % (Caucasien) et 80 % (Afro-Américain) (Vesa et al., 2000). La libération des aliments probiotiques du carcan laitier apparaît donc essentielle pour favoriser l'accessibilité de leurs bénéfices aux individus qui en sont toujours

tenus éloignés. De plus, sans faire consensus, certaines études ont aussi démontré une diminution de l'absorption du lactose accompagnant le vieillissement (Vesa et al., 2000). La nature laitière des produits probiotiques restreint donc leur consommation régulière par les individus âgés, un groupe pourtant parmi les plus à même de bénéficier du bienfait des probiotiques. En effet, au cours du vieillissement, les microorganismes bénéfiques peuplant l'estomac tendent à décroître en nombre au profit de pathogènes potentiels, ce qui se traduit par une augmentation des risques de maladies gastro- intestinales telles que les cancers, des problèmes de constipation, et de nombreux types de diarrhées (Mitsuoka, 1992). L'utilisation courante de probiotiques apparaît comme une approche préventive intéressante à développer pour lutter contre ces effets (Kolida et al., 2006). Afin de maximiser la consommation et diversifier les sources de probiotiques, il devient donc important d'étendre l'enrichissement en probiotiques à une plus vaste gamme de produits.

La sève de raphia pourrait être une matrice intéressante du fait que celle-ci subit généralement une fermentation brusque conduisant au vin de raphia. En effet, cette fermentation est un indicateur car cela sous-entend que celle-ci peut permettre l'incorporation des probiotiques (ici *L. fermentum* et *B. bifidum*). Ce travail intervient donc non seulement dans un esprit de valorisation de la sève de raphia qui est un produit local mais aussi et surtout dans une dynamique de diversification de la gamme des produits probiotiques. Ainsi, L'objectif principal de ce travail est de déterminer les conditions optimales de fermentation de la sève de raphia par *L. fermentum* et *B. bifidum* dans le cadre de la production d'une boisson probiotique. Plus spécifiquement, il s'agira de caractériser la sève sur le plan physicochimique, modéliser l'impact de chaque facteur de la fermentation sur les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de la boisson obtenue et enfin de procéder à l'optimisation de ces réponses pour ressortir les conditions opératoires optimales.

PARTIE 2: REVUE DE LA LITTERATURE

I-LES PROBIOTIQUES

I-1 Historique et définitions

I-1-1 Historique

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe, et professeur à l'Institut Pasteur à Paris) a postulé que les bactéries lactiques (LAB) offraient des bénéfices pour la santé, conduisant à une plus grande longévité. Il a suggéré que « l'auto intoxication intestinale » et le vieillissement qui en résultait pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant les microbes protéolytiques tels que *Clostridium* qui produisent des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par des microbes utiles. Il développa un régime alimentaire à base de lait fermenté par une bactérie qu'il appela « Bacille bulgare ». En 1917, avant la découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming, le professeur allemand Alfred Nissle isola une souche non pathogène d'*Escherichia coli* à partir des selles d'un soldat de la première guerre mondiale qui n'avait pas développé d'entérococolite lors d'une épidémie sévère de shigellose. Les troubles du tractus intestinal étaient fréquemment traités par des bactéries vivantes non pathogènes pour modifier ou remplacer la flore microbienne intestinale. La souche d'*Escherichia coli* isolé par Nissle en 1917 est un des rares exemples de probiotique qui ne soit pas une bactérie lactique. Une Bifidobactérie a été isolée par Henry Tissier (de l'Institut Pasteur) à partir des selles d'un enfant nourri au sein. Il l'appela *Bacillus bifidus communis*. Tissier affirma que la bifidobactérie remplacerait la bactérie protéolytique qui cause la diarrhée et il recommanda l'administration de bifidobactéries aux enfants souffrant de diarrhée. Le terme "probiotique" fut introduit pour la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell ; par opposition aux antibiotiques, les probiotiques furent définis comme des facteurs dérivés des microorganismes et stimulant la croissance des autres organismes. En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la nécessité de viabilité des probiotiques et a introduit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte.

I-1-2 Définitions

En 2001, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont donné une définition officielle des probiotiques qui sont des « *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels* ». Par extension, il existe des définitions plus larges qui ne font pas référence à

l'alimentation, et où le mot "ingérés" peut être remplacé par "administrés". Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus communément utilisées comme probiotiques, mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* et quelques espèces de *E. coli* et de *Bacillus* sont également utilisées comme probiotiques. Les bactéries lactiques, y compris des espèces de *Lactobacillus*, utilisées pour la conservation des aliments par fermentation depuis des milliers d'années, peuvent jouer un double rôle comme agents de la fermentation alimentaire et comme agents bénéfiques pour la santé. Cependant, le terme « probiotique » devrait être réservé aux microorganismes vivants pour lesquels un bénéfice pour la santé a été démontré dans des études contrôlées. (Aslim et al., 2004 .

I-2 Les principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique

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).

Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique sont répertoriées dans le tableau 2.

Tableau 2: Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Shah, 2007).

Espèces de Lactobacillus		
<i>Lb. Acidophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb fermentum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Espèces de Bifidobacterium		
<i>Bf. lactis</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Bf. infantis</i>
<i>Bf. longum</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bf. Breve</i>
<i>Bf. adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lc. Lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. thermophilus</i>	

I-2-1 Bifidobacterium

La découverte des bifidobactéries remonte au début du 20^e siècle lorsqu'Henri Tissier les a isolées de selles d'enfants nourris au lait maternel (Tissier, 1900). Les bifidobactéries figurent parmi les groupes bactériens anaérobies dominants du microbiote du côlon humain. Des onze espèces d'origine humaine que comprennent les 31 espèces de bifidobactéries, neuf ont été isolées du côlon. Les bifidobactéries sont des bâtonnets à Gram positif aux formes variées, non sporulant et en général anaérobies stricte, globalement neutrophiles et mésophiles, non-mobiles, non capsulés, ne produisant pas de gaz et catalase négatif (Killer et al. 2010; Leahy et al. 2005; Lee et O'Sullivan, 2010). En microscopie elles adoptent une forme de bâtonnet épais irrégulier et peuvent pour certaines souches et sous certaines conditions de stress, prendre une forme caractéristique de V ou de Y appelée bifide (Lee et O'Sullivan, 2010; Tannock, 1997; Turroni et al. 2009). Génétiquement, les bifidobactéries possèdent un ADN riche en guanine et cytosine (42 à 67 %) et très peu de plasmides. Les bifidobactéries qui appartiennent aux actinobactéries, sont des organismes saccharolytiques fermentant le glucose, le fructose et le galactose et sont considérées comme hétérofermentaires. Ainsi, la production d'acide acétique, d'acide lactique, d'acide formique, d'éthanol et, en petite quantité, d'acide succinique peut résulter du métabolisme fermentaire des bifidobactéries. L'acide acétique et l'acide lactique, les principaux acides organiques excrétés, sont produits dans un rapport molaire avoisinant 3 : 2 par mole de glucose qui varient selon les conditions du milieu et le niveau de stress que subit la bactérie (Jalili et al. 2009; Roy et al. 2011). La métabolisation des sucres entraînant la production de ces acides est effectuée de façon quasi spécifique grâce aux bifidobactéries, par la voie du fructose-6-phosphate, couramment appelée la voie métabolique bifidus (Tannock. 1999). Cette voie métabolique fournit aux bifidobactéries davantage d'ATP que les voies fermentaires habituelles des autres bactéries. La fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK, E.C.4.1.2.2), une enzyme unique et déterminante de ce processus, est d'ailleurs couramment utilisée comme marqueur dans l'identification ou la détection des bifidobactéries (Pokusaeva et al., 2011).

Les espèces de bifidobactéries sont à quelques exceptions près, des colonisateurs des systèmes digestifs (cavité orale comprise) des mammifères, des oiseaux ainsi que des insectes (Killer et al., 2010; Turroni et al., 2009), et sont particulièrement adaptées à cet environnement. En effet, chez l'Homme, des années de cohabitation et de coévolutions ont entraîné la spécialisation des bifidobactéries pour certaines sections du système digestif ou pour certaines périodes de l'existence humaine. En effet, des espèces de bifidobactéries

nichent dans la bouche, d'autres sont exclusivement intestinales (principalement vers la fin du côlon), alors que certaines peuvent être transloquées de l'intestin aux glandes mammaires, probablement par des cellules de l'immunité, d'où elles peuvent investir le lait destiné au nouveau-né (Arboleya et al. 2010). On observe aussi une succession des espèces de bifidobactéries entre la naissance, où les caractéristiques bifidogéniques du lait maternel font de certaines espèces de bifidobactéries les principaux habitants du tractus digestif infantile; l'âge adulte, où les espèces de bifidobactéries intestinales perdent leur hégémonie et sont davantage adaptées à une régime alimentaire varié; et la vieillesse, pendant laquelle on peut assister à une diminution des populations de bifidobactéries (Biagi et al. 2011; O'Toole et Claesson, 2010), impliquant ainsi, en conjugaison à la localisation biologique, une spécialisation temporelle au sein de l'intestin. Malgré ces spécialisations diverses, les bifidobactéries font preuve d'un haut degré de conservation et d'une forte syntonie, soit la conservation de l'ordre et de l'organisation d'un groupe de gènes sur plusieurs génomes (Ventura et al., 2009).

Dans une même optique d'adaptation au système digestif, plusieurs souches de *Bifidobacterium* ont démontré leur capacité à traverser les barrières intestinales et à atteindre l'intestin vivantes et actives (Kailasapathy et Chin, 2000; Kheadr, 2006; Masco et al., 2007) de même que leur capacité à adhérer au mucus ou aux cellules intestinales (Ouwehand et al., 1999). Les bifidobactéries ont aussi montré leur grande capacité à utiliser une vaste gamme de composés carbonés de l'environnement intestinal dont plusieurs polymères indigestes par l'homme ou produits par celui-ci comme, entre autre, la mucine. La nature prototrophe des bifidobactéries leur confère de plus une forte capacité dans la métabolisation des vitamines, des acides aminés et de plusieurs autres composés pour lesquels la compétition est féroce au sein de l'intestin, ce qui favorise d'autant la compétitivité et la persistance dans cette niche (Klijn et al., 2005; Lee et O'Sullivan, 2010; Turroni et al., 2009; Ventura et al., 2009). De plus, les bifidobactéries produisent des exopolymères (EPS) pouvant favoriser leur implantation dans le système digestif et les protégeant, entre autres, de composés toxiques tels que les sels biliaires. Certaines souches produisent aussi des antibiotiques, une classe de bactériocine à large spectre favorisant leur compétitivité au sein de l'intestin, et peuvent aussi produire des composés, comme les serpins, capables de moduler la réponse immunitaire intestinale et ainsi favoriser leur implantation dans le côlon (Klijn et al. 2005; Lee et O'Sullivan, 2010; Turroni et al. 2009). Ces deux types de molécules, en affectant les autres microbes intestinaux ou en « dialoguant » avec les cellules de l'hôte, sont à même de produire

des effets bénéfiques sur le bien-être intestinal. Il ne suffit que d'ajouter à ces caractéristiques l'impact positif sur diverses facettes de la santé qu'ont démontré les bifidobactéries suivant leur ingestion (Leahy *et al.*, 2005; Lee et O'Sullivan, 2010; Picard *et al.*, 2005; Turrone *et al.*, 2009) ainsi que leur sécurité évidente comme symbiote de l'humain confirmée par leur long historique de consommation sécuritaire associée à l'alimentation (Picard *et al.* 2005) pour saisir l'intérêt que représentent les bifidobactéries pour le secteur des probiotiques.

I-2-2 Lactobacillus

Les *Lactobacillus* sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram positif, non-sporulantes et catalase négative (Podlesny *et al.*, 2011). Le genre *Lactobacillus* a fort probablement la plus longue histoire en matière de bienfaits santé associés aux microorganismes. C'est d'ailleurs ce genre qui fut à l'origine des premières théories probiotiques énoncées par Metchnikoff à la tombée du 19^e siècle (Kleerebezem et Vaughan, 2009). Le genre *Lactobacillus* comprend au moins 145 espèces reconnues pour - contrairement aux bifidobactéries - présenter une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême. Cette diversité se constate aisément dans la multitude de génomes associés au genre et jusque dans ses caractéristiques structurales où l'on peut retrouver par exemple des contenus en G/C variant entre 30 et 60 % selon les espèces (Kleerebezem et Vaughan, 2009; Ventura *et al.*, 2009). Globalement, les lactobacilles présentent une tendance à l'hyperspécialisation écologique, et se révèlent considérablement auxotrophes quant à par exemple, la synthèse d'acide aminé. Cette auxotrophie est couramment compensée par une phénoménale capacité d'internalisation et une multitude de transporteurs leur permettant de s'approvisionner efficacement dans leur milieu (Kleerebezem et Vaughan, 2009). C'est ainsi que, fortement adaptés au système digestif, les lactobacilles intestinaux présentent généralement des avantages probiotiques notables sur les membres du même genre habitués à d'autres niches.

Les *Lactobacillus* constituent également, entre autres, une part importante du microbiote humain et animal (Bernardeau *et al.*, 2006; Gomes et Malcata, 1999). Chez l'humain en santé, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon, et pourraient représenter 1 % du contenu intestinal (Vélez *et al.*, 2007). Les lactobacilles sont aussi les principaux membres du microbiote urogénital féminin au sein duquel ils jouent un rôle essentiel dans le maintien d'une saine homéostasie en nuisant à l'apparition de maladies, comme la vaginite bactérienne (Stoyancheva *et al.*, 2006). Il est à noter qu'une voie naturelle externe reliant la région anale et les organes génitaux de la femme permet le transfert des

microorganismes intestinaux, pathogènes ou bénéfiques, dont des lactobacilles, du premier vers le second (Reid et al., 2011). À la suite de leur ingestion, les *Lactobacillus* ont d'ailleurs démontré des actions bénéfiques sur la santé à ce niveau, ainsi que de nombreux autres impacts positifs au niveau intestinal et systémique (Bernardeau et al., 2006; Kolida et al., 2006; Lebeer et al., 2008; Reid et al., 2003). La production de composés antimicrobiens par certaines souches de *Lactobacillus* s'avérerait un important mécanisme d'interaction avec les autres commensaux du corps humain et favoriserait leur action antipathogène (Holzapfel et al., 2001; Ventura et al., 2009). Les lactobacilles possèdent la capacité d'établir un « dialogue » avec les cellules de leur hôte, et d'influencer ainsi leur développement et leur métabolisme (Alemka et al., 2010; Dykstra et al., 2011).

Plusieurs lactobacilles ont aussi montré leur intérêt probiotique par leur capacité à traverser les barrières du système gastro-intestinal. et à atteindre les intestins vivants et actifs (Holzapfel et al., 2001; Prasad et al., 1998) ainsi que leur capacité à adhérer au mucus ou aux cellules intestinales (Bernardeau et al., 2006; Tuomola et Salminen, 1998). À cet effet, les lactobacilles peuvent être dotés de nombreuses molécules de surface dont la présence et le type varient largement entre les espèces, et qui leur permettent d'adhérer à plusieurs composés dont certains retrouvés sur les cellules épithéliales, le mucus intestinal ou les aliments ingérés (Vêlez et al., 2007).

Bien que les *Lactobacillus* soient globalement considérés comme sécuritaires (Gibson et Roberfroid, 1995; Holzapfel et al., 2001; Reid et Hammond, 2005; Sanders et Huis in't Veld, 1999), il semble que quelques cas de lactobacillémie - principalement, des endocardites et des bactériémies - aient été associés à la consommation de certains *Lactobacillus* probiotiques, essentiellement chez des personnes âgées ou immunodéprimées. Des sidéens ont néanmoins été traités aux lactobacilles sans que l'on observe le développement d'effets nocifs (Bernardeau et al., 2006; Boyle et al., 2006). Il apparaît que les infections aux *Lactobacillus* soient couramment des marqueurs d'une maladie sous-jacente importante. Les lactobacilles semblent, en effet, démontrer une pathogénicité que dans certaines conditions et chez des patients présentant certaines prédispositions et ayant consommé de très grandes doses du probiotique (Sanders et al., 2010). Toujours d'un point de vue sécuritaire, des plasmides sont couramment observés chez les lactobacilles. Ils peuvent induire de réels effets phénotypiques sur leur hôte, et jouent un rôle métabolique souvent essentiel dans la colonisation d'une niche. Par exemple, certains lactobacilles portent des plasmides correspondant à plus de 10% du matériel codant et permettant la production de bactériocine, d'enzymes hydrolysant la bile et

de compléments de voie métabolique (Ventura et al., 2009). Dans une optique de sécurité, les plasmides portés par les lactobacilles probiotiques requièrent donc d'être étudiés. Malgré tout, le risque associé à la consommation de *Lactobacillus* reste faible (Bernardeau et al., 2006) comme en témoigne leur utilisation traditionnelle multimillénaire dans les aliments (Lebeer et al., 2008). Ainsi, en France, le risque de contracter une infection associée aux *Lactobacillus*, estimé sur un siècle de consommation, équivaut à 1 sur 10 millions alors que le risque global de lactobacillémie est inférieur à 1 sur 1 million (Bernardeau et al., 2006; Sanders et al., 2010). Il est donc clair que les *Lactobacillus* possèdent les caractéristiques requises aux probiotiques.

I-3- Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée, car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne.

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques...etc (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et al., 2008).

Le tableau 03 rapporte les critères les plus utilisés dans différents laboratoires pour le screening des probiotiques

Tableau 3: Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques

Critères	But recherché
- Résistance à l'acidité gastrique	- Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
- Résistance aux sels biliaires	- Survie pendant le passage par l'intestin grêle
- Production d'acide (à partir de glucose et de lactose)	- Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
- Adhésion au mucus et/ou aux cellules	- Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface

épithéliales humaines

- | | |
|---|---|
| - Production de substances antimicrobiennes | - Inhibition du développement des germes pathogènes |
| - Résistance à la chaleur | - Survie pendant le processus de transformation |
| - Bonnes propriétés technologiques | - La stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages |

Source :Nousiainen *et al.*, 2004.

1-3-1 La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

1-3-2 La résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu *et al.*, 2008).

1-3-3 L'adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares *et al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan *et al.*, 2011). En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

1-3-4. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les

bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek et al., 1996 ; Labioui et al., 2005).

1-3-5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et al. (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine.

Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autres espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007).

1-3-6. Critères technologiques

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela et al. (2000), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique ;
- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

I-4. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Le tableau 4 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé documentés et rapportés dans la littérature.

Tableau 4: Les principaux effets bénéfiques attribués aux

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</i> , <i>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

Source :Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008

I-5. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif.

Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée ; ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité alimentaire et en stimulant l'immunité, ceci suggère qu'il faut un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de

vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005).

I-6. Applications des probiotiques

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits plurisouches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (Patterson, 2008) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ; - Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ; - Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (Patterson, 2008). La survie des probiotiques dans les produits est affectée par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation et de stockage. Les nouvelles technologies, comme la microencapsulation et la technologie des cellules immobilisées, offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires. Les fabricants commercialisent de nouveaux vecteurs d'administration de probiotiques comme des pailles et des capsules de bouteille qui, lorsque percées ou brisées, délivrent des doses thérapeutiques de probiotiques dans un produit alimentaire (Kailaspathy, 2002 ; Patterson, 2008).

I-7 Combinaisons de probiotiques

La combinaison de différentes souches probiotiques est de plus en plus étudiée puisqu'elle permet de combiner les caractéristiques probiotiques santé de deux souches. En effet, les combinaisons de probiotiques pourraient avoir un avantage dans la réduction des risques et des symptômes de maladies aux causes complexes et hétérogènes telles que le côlon irritable. En augmentant le nombre de souches, on peut effectivement espérer accroître les effets positifs en additionnant les effets propres à chaque souche (Matto *et al.*, 2006; Oksajarju *et al.*, 2011). De plus, de nombreux exemples retrouvés dans la littérature démontrent une augmentation du pouvoir bénéfique santé des combinaisons de probiotiques

et, le cas échéant, une amélioration de leurs caractéristiques fonctionnelles (Collado et *al.*, 2007; Femia et *al.*, 2002; Juntunen et *al.*, 2001; Ouwehand et *al.*, 2000. Il est cependant fort important de tester l'interaction entre les souches du complexe afin de déterminer la meilleure combinaison possible. Les différentes combinaisons doivent être testées et les caractéristiques probiotiques des souches pures doivent être comparées à celles des complexes afin de justifier leur combinaison. En effet, les combinaisons de souches antagonistes peuvent se révéler moins efficaces que les formules à une seule souche (Collado et *al.*, 2007). Par exemple, la production de molécules antagonistes, telles que des bactériocines, ou d'autres métabolites comme des acides, peut nuire à la coexistence des probiotiques (Dave et Shah, 1997). Le caractère négatif de certaines combinaisons sur les capacités probiotiques de certains microorganismes a d'ailleurs déjà été démontré. Des associations de probiotiques ont par exemple diminué l'efficacité de l'adhésion sur la muqueuse intestinale des souches combinées (Collado et *al.*, 2007; Kolida et *al.*, 2006). Généralement, l'augmentation de la variété des genres au sein d'un mélange affecterait davantage les caractéristiques probiotiques des souches le composant. Les capacités probiotiques des bifidobactéries en particulier seraient davantage sensibles à la présence d'autres genres. Les caractéristiques probiotiques des *Lactobacillus* tendraient, au contraire des bifidobactéries, à s'amplifier au sein des combinaisons (Chapman et *al.*, 2011).

I-8 Incorporation des probiotiques dans les aliments

Les probiotiques sont consommés sous deux principales formes : les suppléments en capsules et les aliments (Champagne et *al.*, 2011). Cependant, les bénéfices apportés par les probiotiques sous forme lyophilisée en capsules n'égalent pas ceux d'un aliment probiotique. En effet, le peu de temps passé dans l'intestin pourrait s'avérer insuffisant pour l'activation métabolique des souches lyophilisées (Ejtahed et *al.*, 2011; Lewis et Burmeister, 2005). En outre, les aliments constituent la forme la plus appréciée et la plus répandue pour la consommation de probiotiques. Pour ces aliments, dont la quantité et la variété explosent sur les marchés, le défi réside principalement dans le maintien de la survie des microorganismes et de leurs caractéristiques probiotiques. En effet, entre la fabrication et la consommation d'un aliment probiotique, de nombreux facteurs peuvent affecter la viabilité des probiotiques et doivent être pris en compte.

I-8-1 Quantité de probiotiques

Pour être efficaces, les probiotiques doivent atteindre l'intestin en quantité suffisante (Kailasapathy et Chin, 2000). Il apparaît clairement que pour concurrencer le microbiote

intestinal - estimé à 10^{14} bactéries - et influencer positivement la santé, une dose minimale importante de probiotiques est requise (Thomsen, 2006). De plus, en dépit de la sélection rigoureuse de microorganismes adaptés et d'une matrice de transport optimale, la traversée du système digestif et de ses conditions bactéricides entraîne une diminution importante du nombre de probiotiques viables arrivant à destination (Tamime et al., 2007). C'est donc ultimement la quantité de probiotiques (10^7 - 10^{10}) atteignant son site d'action qui sera critique dans l'obtention des bienfaits attendus plutôt que la quantité de probiotiques ingérée (Roy, 2005).

I-8-2 Conservation des concentrés de probiotiques

La stratégie commune d'introduction de probiotiques dans un aliment repose principalement sur l'ajout des bactéries directement au produit. Cette façon de faire exige d'atteindre les quantités adéquates de probiotiques tout en ajoutant un minimum de supplément à l'aliment. Elle nécessite donc l'utilisation d'un matériel de départ probiotique très concentré (Santivarangkna et al., 2008). Les probiotiques sont généralement ajoutés au produit sous forme de culture concentrée séchée ou en culture congelée (Saarela et al., 2006). Toutes les étapes du processus, de la production de ces concentrés à leur ajout au produit, peuvent affecter la viabilité des microorganismes.

Les différentes méthodes de conservation des concentrés de probiotiques sont principalement la congélation, la lyophilisation et l'atomisation (Santivarangkna et al., 2008). La lyophilisation consiste en la déshydratation de cultures saturées et congelées par sublimation sous faible pression et température. Pour sa part, l'atomisation consiste en la déshydratation en fines particules d'un produit par son atomisation dans un flux d'air chaud. Certaines étapes de ces procédés peuvent tuer les microorganismes ou entraîner des blessures qui leur seront fatales lorsqu'ils seront introduits dans l'environnement stressant du produit alimentaire (Santivarangkna et al., 2008). Les cellules concentrées congelées ou lyophilisées peuvent d'abord être sujettes à des blessures occasionnées par le froid. Ces blessures résultent principalement de la formation de glace intracellulaire, ce qui affecte l'intégrité membranaire. L'obtention de gros cristaux de glace, qui sont les plus dommageables pour la cellule, s'obtient lorsque la vitesse de congélation est trop lente (Santivarangkna et al., 2008). Une vitesse minimale de congélation, variant selon les souches, ne doit donc pas être dépassée.

Par ailleurs, au cours du séchage par atomisation, les cellules sont vaporisées dans une chambre sous haute température (150-200 °C). Cette chaleur peut amener une dénaturation des molécules ou des structures microbiennes. Encore une fois, la résistance à cette chaleur

varie selon les souches et selon les protocoles industriels utilisés (température, temps passé dans la chambre d'atomisation, etc.) (Santivarangkna et al., 2008). Les méthodes reposant sur la déshydratation des souches sont aussi à même de provoquer un assèchement important et mortel des cellules. D'abord, ce phénomène peut s'observer durant la congélation menant à la création de stocks congelés ou encore lors de celle nécessaire à la lyophilisation. La cristallisation progressive de l'eau du milieu de congélation entraîne la concentration des solutés au sein des zones toujours liquides. Dans ces zones, la différence de pression osmotique qui se crée entre la cellule et son milieu hypertonique entraîne une sortie de l'eau vers le milieu, et ainsi, un assèchement cellulaire graduel. Cette situation est favorisée lorsque la congélation est trop lente, et peut se traduire par une inactivation de la cellule. Encore une fois, une vitesse optimale de congélation est donc à respecter pour maximiser la viabilité des concentrés probiotiques (Santivarangkna et al., 2008). Ensuite, un assèchement marqué peut aussi être observé au cours de la période de sublimation, lors de la lyophilisation, ou dans la chambre d'atomisation, lors du séchage par atomisation. Une perte trop importante d'eau peut causer de graves dommages aux membranes et affecter l'acide nucléique ainsi que les protéines (Santivarangkna et al., 2008).

Au-delà des étapes mécaniques de conservation, d'autres paramètres sont à considérer lors de la préparation de concentrés probiotiques. La composition du milieu de congélation doit être prise en compte. En effet, l'ajout de composés cryoprotectants au milieu de congélation - comme le saccharose, le trehalose et le lait écrémé - favorise le maintien de l'intégrité membranaire, et ainsi, la viabilité cellulaire (Kanmani et al., 2011; Santivarangkna et al., 2008). Les milieux de conservation sont aussi couramment composés d'acide ascorbique, ou d'autres molécules au pouvoir antioxydant, qui diminuent la formation ainsi que l'impact des radicaux libres sur les cellules.

L'atmosphère, tout comme la température d'entreposage, joue aussi un rôle primordial dans le maintien de la viabilité de probiotiques asséchés. En effet, ce sont les niveaux d'humidité et de températures les plus bas qui permettent un métabolisme microbien minimal et favorisent ainsi, en empêchant les activités autolytiques ou la production de composé potentiellement toxique, le meilleur maintien de la viabilité (Dianawati et Shah, 2011).

I-8-3 Préparation des souches

Préalablement à leur addition au produit, la décongélation et la réhydratation des concentrés probiotiques s'avèrent aussi particulièrement critiques dans le maintien de la viabilité des bactéries qu'ils contiennent. D'abord, il est important d'éviter la décongélation et la recongélation successive et courante des concentrés probiotiques congelés. En effet, au court de la décongélation, les premiers liquides apparaissant sont suffisamment hypertoniques pour affecter les cellules qui s'y trouvent (Walker et *al.*, 2006b). Les cycles gel et dégel, deux étapes qui meurtrissent les cellules, peuvent affecter leur viabilité. Pour les ferments, une décongélation rapide à des températures inférieures aux températures maximales des microorganismes (généralement 20-45 °C) s'est avérée la méthode permettant le meilleur maintien de la viabilité (Champagne et *al.*, 2011). La durée de réhydratation des concentrés séchés, la température à laquelle elle est effectuée ainsi que le milieu dans lequel elle a lieu devraient aussi être contrôlés pour favoriser la survie des souches probiotiques. Globalement, une température variant entre 20 et 35 °C, d'une durée de 10 à 30 min dans un milieu isotonique et neutre, constituent les conditions permettant de récupérer un maximum de cellules viables des concentrés probiotiques lors de la réhydratation précédant l'ajout à l'aliment (Champagne et *al.*, 2011).

I-8-4 Nature physico-chimique de l'aliment probiotique

La stabilité du probiotique durant l'entreposage de l'aliment dépend grandement des caractéristiques physico-chimiques de son environnement. En effet, le pH, la disponibilité ou activité de l'eau (a_w), la présence d'oxygène ainsi que les nutriments présents dans le milieu peuvent influencer la viabilité des souches probiotiques (Champagne et *al.*, 2005; Mattila-Sandholm et *al.*, 2002; Sanders et Huis in't Veld, 1999). Ainsi, la nature physicochimique de l'aliment est à considérer.

- Le pH du produit semble particulièrement important dans le maintien de la viabilité des probiotiques. Ce sont généralement les pH trop acides des aliments qui s'avèrent néfastes aux cultures probiotiques et qui entraînent une diminution de leur viabilité (Champagne et *al.*, 2005).
- **La disponibilité de l'eau (a_w)** est parfois considérée comme l'un des stress principaux que devra supporter un probiotique au sein d'une matrice alimentaire (Sleator et Hill, 2008). Beaucoup de bactéries requièrent une présence d'eau libre environ égale ou

supérieure à une a_w de 0.95 (Grant, 2004). Certaines bactéries lactiques sont cependant couramment en mesure de soutenir des a_w inférieures à 0,96 (Clavero *et al.*, 2000).

- **Le stress oxydatif** : il réfère à la présence dans le milieu des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) qui apparaissent lors de la réduction de l'oxygène (O_2) en H_2O . On compte parmi eux : Fanion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyde (OH^*) (De Angelis et Gobbetti, 2004). L'oxygène affecte les cultures sensibles soit directement ou indirectement. D'abord, certains probiotiques transforment directement l'oxygène en DRO qui s'accumule alors dans leur cytoplasme et altèrent les composantes cellulaires. D'une autre manière, certains microorganismes aérotolérants transforment en DRO qu'ils libèrent dans le milieu, et qui peuvent alors affecter les cellules sensibles (De Angelis et Gobbetti, 2004).
- **Matrice du produit** : les composés et molécules constituant l'aliment peuvent aussi influencer la survie des probiotiques. En effet, les molécules antibactériennes contenues naturellement dans les aliments sont en mesure de causer une chute sévère de la viabilité même lorsque les paramètres physico-chimiques sont contrôlés.

II- Le *Raphia* (*Raphia farinifera*) (Gaertn.) Hyl.,(1952)

Raphia farinifera (Gaertn.) Hyl., ou Palmier *Raphia* appartient à la famille des Arecaceae à la sous-famille des Calamoideae et au genre *Raphia* qui comprend environ 20 espèces principalement africaines.

II-1 Origine et distribution géographique *Raphia farinifera*

Raphia farinifera est réparti dans toute la partie méridionale de l'Afrique tropicale. Cette espèce est fréquemment cultivée par exemple au Nigéria, à Madagascar, aux Seychelles, à l'île de La Réunion, en Inde, aux États-Unis et aux Petites Antilles. *Raphia farinifera* s'est parfois naturalisé.(Gaertn.,1952)

II-2 Description de *Raphia farinifera*

Raphia farinifera est un palmier monoïque, à troncs multiple ou unique pouvant atteindre une hauteur de 25 m, pour un diamètre de 100 cm. La partie inférieure du stipe est marquée par les cicatrices foliaires, avec parfois la présence de racines adventices.

Les feuilles sont pennées, érigées, atteignant 20 m de long. Ce sont les feuilles les plus longues du règne végétal. Les feuilles sont brillantes au-dessus, cirieuses au-dessous ; les

folioles jusqu'à 150 sur chaque côté du rachis sont insérées sur 2 plans, linéaires, raides, atteignant 200 cm de longueur pour une largeur de 8 cm, bords et nervures principales à épines jaunâtres atteignant 4 mm de long. La gaine et le pétiole mesurent environ 1,5 m de long, pétiole de 12 à 20 cm de diamètre, rachis inerme orange brun.

Les espèces de raphia ont des tiges monocarpiques, c'est à dire qu'ils fleurissent et fructifient qu'une seule fois, puis meurent. La plante peut produire des rejets qui recommencent un nouveau cycle.

Les inflorescences sont axillaires retombantes atteignant 4 à 6 m de long, ramifiées en 2 ordres. Les fleurs sont unisexuées, les fleurs mâles à l'apex des rameaux de l'inflorescence, les fleurs femelles à la base. Le fruit est ovoïde à ellipsoïde de 4,5 à 11 cm de long, de 3 à 6 cm de large, à bec atteignant 5 mm de long, couvert d'écaillés. Généralement, un fruit produit une graine et celle-ci est et mesure entre 3 à 6 cm de long et 3 à 4.5 cm de large. La figure 2 présente une photo de *Raphia farinifera*.



Figure 2: Photo de *Raphia farinifera* (Gaertn.,1952)

II-3 Utilisations de *Raphia farinifera*

Les feuilles sont utilisées pour la couverture des toits, les folioles et rachis pour le tressage, l'ébénisterie, la construction de maisons, les clôtures, les échelles et comme perches. Le jeune bourgeon terminal. le cœur de palmier est consommé comme légume. Le palmier est saigné pour la sève qui est fermentée en vin de palme. Les fruits et les graines sont consommés, la pulpe du fruit est fermentée en une boisson alcoolisée. L'huile du mésocarpe et des graines est utilisée comme aliment, beurre de raphia. On transforme les coques des fruits en tabatières ou en boutons, les fruits et les graines sont utilisés pour la décoration.

II-4 Production et Utilisations de la sève de *Raphia farinifera*

II-4-1 Extraction et utilisation de la sève

L'extraction de la sève du palmier raphia se fait pendant plusieurs heures dans un container. La sève est récoltée à même l'arbre, qui peut produire jusqu'à 15l par jour. La récolte commence par un nettoyage des alentours du palmier suivi du nettoyage et de installation du container qu'on bouche avec des feuilles pour empêcher les insectes de s'y introduire. La sève sort du tronc par un trou généralement creusé au couteau et rentre dans le container grace à un système d'entonnoir. Immédiatement après cueillette, la sève de raphia de couleur clair est très sucré. Avec le temps, il devient de plus en plus alcoolisé du fait de la fermentation par des levures naturelles. Après environ 6 heures il prend la couleur blanche et prend le nom de vin de raphia . Au-delà de la consommation habituelle dans divers points de vente à travers les villes et les villages, Le vin de raphia, très prisé , est très présent pendant les cérémonies traditionnelles où il est utile pour certains rituels.

III-Les plans d'expérience

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x .

Avec les plans d'expériences, on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (**Goupy, 2006**).

III-1 Notions utilisées aux plans d'expériences

III-1 -1 Espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs facteurs ; chacun de ces facteurs peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure 3). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux niveaux notés -1 et +1 (Goupy, 2006). L'espace expérimental, est donc l'espace coincé entre deux axes représentant deux facteurs différents

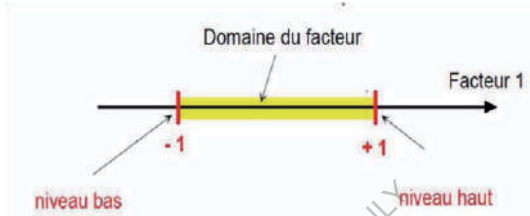


Figure 3: Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

III-1 -2 Surface de réponse

A chaque point du domaine d'étude, correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse.

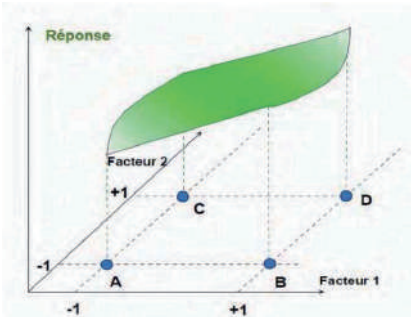


Figure 4: Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

Cette surface de réponse est très importante puisque c'est elle qui représente le comportement de la réponse quand on fait varier les niveaux des facteurs. De sa connaissance, on peut déduire les meilleurs ajustements des facteurs pour répondre à une question donnée. Les plans d'expérience permettent de trouver cette surface de réponse en effectuant un minimum d'essais et on obtenant une bonne précision sur sa localisation. La connaissance de cette surface permet de résoudre la plupart des problèmes qui se pose à l'expérimentateur (Goupy, 2005).

III-2 Notion de modélisation mathématique

III-2-1 Equation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne a priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante :

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$$

Cette fonction est très générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de la série de **Taylor-Mac Laurin**, c'est-à-dire une approximation. Si les dérivées peuvent être considérées comme des constantes, le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_{ij} + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots$$

Où :

- y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse.

- x_i représente un niveau du facteur « i ».

- x_j représente un niveau du facteur « j ».

- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du polynôme (Goupy et Creighton, 2006).

III-2-2. Erreur

L'erreur est la variation inexplicable dans un ensemble d'observation. On distingue deux types d'erreurs: erreur aléatoire (*random error*) et l'erreur de manque d'ajustement (*lack of fit error*). L'erreur aléatoire, appelée aussi erreur expérimentale, est une erreur due à la variation naturelle dans un processus. L'erreur de manque d'ajustement est une erreur qui se

produit lorsque l'analyse omet un ou plusieurs termes importants ou des facteurs du modèle mathématique (Goupy et Creighton, 2006).

III-2-3 p-value

La p-value est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. On calcule cette p-value à partir du rapport du coefficient à son écart-type (t de Student). (Goupy et Creighton, 2006)

III-2-4 Coefficient de détermination R^2

Le R^2 est une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses. Dans la pratique, il est difficile d'indiquer la valeur d'un bon R^2 car les valeurs varient beaucoup d'une discipline à l'autre ; toutefois , pour un modèle valide celui-ci devrait tendre vers 1 (Goupy et Creighton, 2006).

III-3 Types de plans d'expériences

Il existe plusieurs types de plans d'expériences qui permettent de s'adapter à la plupart des situations (Goupy, 2006) :

- ✓ Les plans factoriels complets ;
- ✓ Les plans factoriels fractionnaires ;
- ✓ Les plans de Plackett et Burman ;
- ✓ Les plans Taguchi ;
- ✓ Les plans pour surfaces de réponses ;
- ✓ Les plans de mélanges ;
- ✓ Les plans complètement randomisés ;
- ✓ Les plans des blocks randomisés ;
- ✓ Les plans optimaux ;
- ✓ Les plans pour simulations numériques ;
- ✓ Les plans booléens.

Le bon choix d'un plan expérimental maximise la quantité d'information qui peut être obtenue pour un effort expérimental donné. Le choix d'un plan d'expérience dépend des objectifs de l'expérience et du nombre de facteurs étudiés, selon les objectifs expérimentaux rencontrés (Sado et Sado, 2000).

III-3-1 Les plans pour surface de réponse

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ces plans sont utiles à chaque fois que l'on se trouve près d'un maximum ou d'un minimum. Il existe plusieurs types de plans du second degré dont nous intéressons en particulier au modèle de Box Behnken.

III-3-1-1 Le modèle Box-Behnken

Le modèle Box-Behnken est un modèle factoriel fractionnaire à trois niveaux développée par Box et Behnken (Box et Behnken, 1960). Le modèle peut être considéré comme une combinaison entre un modèle factoriel à deux niveaux et un modèle à blocs incomplets. Dans chaque bloc, certains facteurs sont soumis à toutes les combinaisons du modèle factoriel, tandis que les autres facteurs sont maintenus à leurs niveaux centraux.

Le modèle de Box-Behnken part des modèles de choix pour la méthodologie nommée « surface de réponse », car il permet :

- ✓ des paramètres du modèle quadratique ;
- ✓ la détection des lacunes d'ajustement du modèle ;
- ✓ l'utilisation des blocs (Ferreira *et al.*, 2007).

Le modèle de Box-Behnken offre une alternative économique par rapport au modèle composite centrale, car le nombre des niveaux des facteurs est inférieur à celui de la composite centrale et ne contient pas des niveaux extrêmement hauts ou des niveaux extrêmement bas. Cette approche a été largement utilisée dans les processus d'optimisation des conditions de fermentation, il a été aussi utilisé pour la production des enzymes, la production d'autres métabolites, la production de spores et la production de biomasse, (Yu *et al.*, 1997 ; Sunitha *et al.*, 1998 ; Sadhukan *et al.*, 1999 ; Hujanen *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2002).

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

Pour mener à bien ce travail, il est résumé sur la figure 5 les différentes étapes que nous avons suivies :

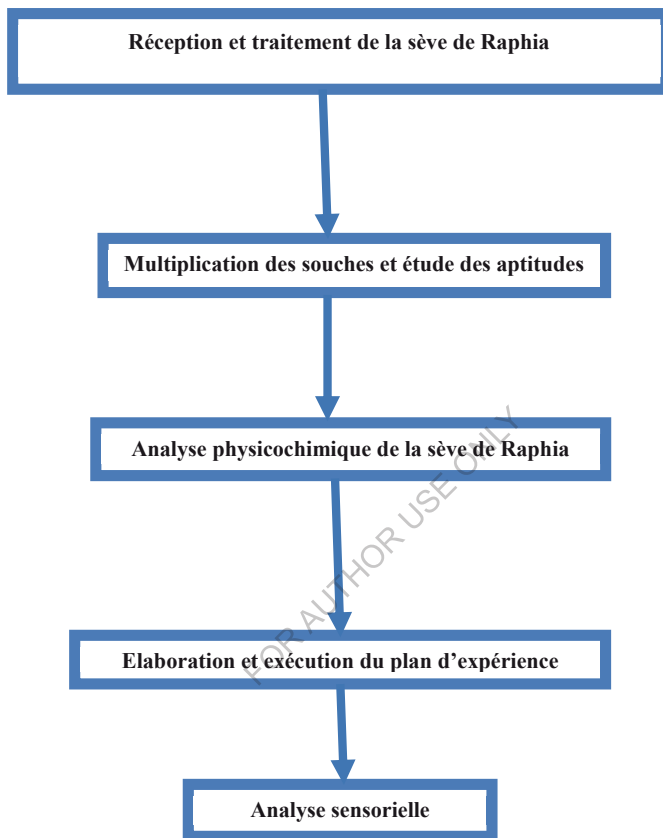


Figure 5: Schéma synoptique du travail effectué

II-1 Matériel

II-1-1 La sève de Raphia

Au cours de ce travail, la sève ou jus de palmier raphia utilisé a été acheté auprès d'un marchand de la ville de Ngaoundéré, dans la région de l'Adamaoua au Cameroun.



Figure 6: Photo des bocaux de sève de raphia

II-1-2 Les ferments

Les ferments purs lyophilisés suivants ont été utilisés:

- *Lactobacillus fermentum*
- *Bifidobacterium bifidum*



Figure 7: Photos des emballages des deux ferments lyophilisés

II-1-3 Les antibiotiques

Ils ont permis d'étudier le comportement des bactéries probiotiques vis-à-vis des antibiotiques. 10 antibiotiques ont été utilisés pour réaliser des antibiogrammes : Erythromycine; Chloramphénicol ; Tétracycline; Amoxicilline ; Streptomycine; Cefixime ; Ampicilline ; Oxolinic; pénicilline et sulfonamides.

II-1-4 Les souches indicatrices

4 souches indicatrices ont été utilisées en vue d'étudier l'effet qu'auront les bactéries probiotiques sur le microbiote intestinal normal et parfois pathogène. Il s'agit de :

- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella sp*
- *Bacillus cereus*

II-1-5 Les milieux de culture

- **Les bouillons** : bouillon MRS, bouillon nutritif, eau peptonée
- **Les géloses** : MRS (de Man-Rogosa et Sharp), gélose Mueller-Hinton, gélose nutritive.

II-1-7 Appareillages

Les produits chimiques et appareils de laboratoire seront évoqués dans les différentes méthodes d'analyse développées plus bas.

II-2 Méthodes

II-2-1 Obtention et stérilisation de la sève de raphia

La sève fraîche de moins de 8 h a été achetée auprès d'un vigneron exerçant dans la ville de Ngaoundéré. Aussitôt achetée elle a été acheminée au laboratoire dans un contenant de 25 L puis immédiatement répartie dans des bouteilles de 1 L dans lesquelles elle a été pasteurisée dans un bain marie à 65 °C pendant 30 minutes. Elle a été par la suite refroidie et conservée à 4 °C.

II-2-2 Caractérisation physicochimique de la sève de raphia

La caractérisation physicochimique a été orientée vers les analyses suivantes : détermination de la teneur en eau, teneur en matière sèche, teneur en cendres, de la masse

volumique, teneur en protéines, teneur en sucres , le dosage des composés phénoliques totaux et la détermination de l'acidité titrable.

II-2-2-1 Teneur en eau et en matière sèche

La matière sèche ou résidu sec total est l'ensemble des substances qui ne se volatilisent pas dans les conditions de dessiccation définies par la méthode utilisée. La détermination de la matière sèche a été effectuée par la méthode d'AFNOR (1982). Une masse M_0 de sève a été séchée à 105 °C jusqu'à poids constant dans une étuve pendant 24 heures. Le résidu sec total ou matière sèche (MS) a été exprimé en pourcentage de matière fraîche selon la formule :

$$\%MS = (M_2 - M_0)/(M_1 - M_0) \times 100$$

Avec M_0 : la masse en gramme de la capsule vide; M_1 : masse en gramme de la capsule contenant la prise d'essai avant étuvage; M_2 : masse en gramme de la capsule contenant la prise d'essai;

Le résultat était la moyenne de 3 déterminations.

La teneur en eau a été déduite grâce au taux de matière sèche par la formule :

$$\%H = 100 - MS$$

II-2-2-2 teneur en cendres

Les cendres totales ont été quantifiées par la méthode décrite dans AFNOR (1981). Elle consiste à incinérer complètement un échantillon jusqu'à obtention des cendres blanches dans un four à moufle réglé à 550 °C. Pour cela, les creusets en porcelaine contenant les échantillons issus de l'étuvage à 105±2 °C (M_2) ont été placés dans le four. Après incinération pendant 24 heures, les creusets ont été retirés du four à l'aide des pinces, puis refroidis dans l'atmosphère d'un dessiccateur et pesés (M_3).

➤ *Expression des résultats*

La teneur en cendres par 100 g de MS a été calculée par la formule

$$Tc = \frac{(M_3 - M_1)}{M_2} \times 100, M_1 \text{ étant la masse de la capsule vide. Les résultats sont la}$$

moyenne de trois répétitions.

II-2-2-3 Détermination de la masse volumique

Elle a été faite à l'aide d'un pycnomètre de 10 mL. Le pycnomètre a été préalablement séché dans une étuve à 105 °C et pesé (M0), la sève bien homogénéisée y a été introduite et le pycnomètre a de nouveau été pesé (M1). La masse volumique de la sève a été calculée par la formule suivante :

$$\rho = \frac{M1-M0}{10} \text{ Avec } \rho \text{ en g/mL}$$

Le résultat obtenu est la moyenne de 3 essais.

II-2-2-4 Détermination du °Brix

Le principe de la mesure du Brix d'un échantillon repose sur la détermination du pourcentage de matières sèches solubles assimilables au saccharose.

Le Brix a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre optique (HANNA HI 96801)

Quelques gouttes d'échantillon sont versées sur le prisme au centre de la platine échantillon, ensuite l'on presse la touche READ, et le résultat est donné sur le tableau d'affichage.

II-2-2-5 Détermination du pH

Le pH a été déterminé par immersion de l'électrode du pH-mètre dans les échantillons à température ambiante après 0h, 2h, 4h et 24h d'incubation de la sèveensemencée et lecture de la valeur affichée sur écran (Al-Otaibi, 2009). L'expérience est indépendamment répétée deux fois.

Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on a procédé au dosage de l'acide lactique.

II-2-2-6 Dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry (Lowry et al,1951)

Procédure : La teneur en protéines solubles des échantillons préalablement dilués au centième (1/100) s'est faite par extrapolation sur une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions de concentration connue de sérum albumine bovin (SAB).

- **Préparation du réactif de Lowry**

Solution A : 1 g de carbonate de sodium (Na₂CO₃) a été dilué dans 50 ml de soude (NaOH) 0,1 mol/l.

Solution B : 25 mg de sulfate de cuivre hydraté (CuSO₄, 5H₂O) et 50 mg de tartrate double Na/K ont été dilués dans 5 ml d'eau distillée.

Réactif de Lowry : mélanger le jour de la manipulation 50 ml de solution A et 5 ml de solution B

- **Mode opératoire (annexe 5)**
- **Expression des résultats**

$$C_p = \frac{\text{Masse de l'échantillon}}{\text{Volume de l'échantillon}} \times d$$

Où :

C_p : concentration en protéines de l'échantillon (g/l) ; d : facteur de dilution de l'échantillon = 100

II-2-2-7 Détermination de la teneur en sucres par la méthode au DNS

La sève a préalablement été traitée comme suit ;

Dans une fiole jaugée de 50 mL, on introduit 5 mL de sève, et on y ajoute 2 mL d'éthanol à 70 %, 1 mL d'acétate de zinc (2 g/100 mL) et 1 mL de ferrocyanure de potassium (10,6 g/100 mL) pour la défécation. Le mélange est filtré dans une fiole de 50 mL et le volume du filtrat complété à 50 mL avec de l'eau distillée.

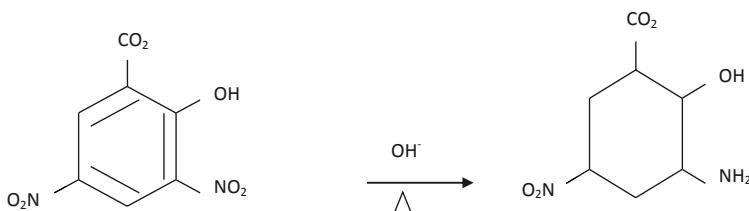
Le dosage quant à lui a été réalisé par la méthode au DNS décrite comme suit :

➤ **Méthode au DNS**

Les sucres ont été dosés selon la méthode décrite par **Fischer et Stein (1961)**.

- **Principe**

En milieu alcalin et à chaud, le DNS réagit avec les sucres solubles et passe de sa forme oxydée jaune à sa forme réduite orange présentant un maximum d'absorption à 530 nm. La coloration est proportionnelle à la longueur d'onde et permet de quantifier les sucres réducteurs en solution (Figure 8).



Acide 3, 5 dinitrosalicylique

Acide 3-amino 5-nitrosalicylique

Composé jaune

Composé orangé

Figure 8: Equation de la réaction de réduction du DNS lors du dosage des sucres réducteurs

Solution de DNS

Dans une fiole de 100 ml,

- peser 1 g de DNS et dissoudre dans 20 ml de NaOH 10%,
- peser 30 g de tartrate double de Na et de K et dissoudre dans 50 ml d'eau distillée jusqu'à la jauge de la fiole,
- mélanger les deux solutions et compléter le volume à 100 avec l'eau distillée.

Standard de maltose

- Préparer la solution standard S_1 de maltose de concentration 2 mg / ml. Pour ce faire, mélanger 0,2 g de maltose dans 100ml d'eau distillée.
- Les solutions standard respectives $S_2 = 0,25$ mg/ml; $S_3 = 0,5$ mg/ml; $S_4 = 1$ mg/ml; $S_5 = 1,5$ mg/ml; ont été préparées par la dilution de la solution S_1 .

Mode opératoire

A l'aide des solutions étalon S_1, S_2, S_3, S_4, S_5 du maltose, la gamme d'étalonnage sera préparée et le dosage des échantillons sera effectué comme indiquée dans **l'annexe 4**.

Expression des résultats

La quantité de sucres réducteurs de chaque prise d'essai est déterminée en se reportant sur la courbe d'étalonnage d'équation de régression : $DO = a Q + b$

Avec, DO : Densité Optique et Q : quantité de sucres réducteurs (mg/L); a, b : Constantes à déterminer

II-2-2-8 Détermination de l'acidité titrable

Elle a été réalisée selon la méthode normée AFNOR (1982) avec la soude (NaOH) 0,01 N en présence de la phénophtaléine.

Pour préparer l'échantillon, 10 mL de sève ont été introduit dans une fiole de 100 mL et l'on a ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée (dilution au 1/10) ;

➤ Dosage proprement dit

- 0,1 mL de phénophtaléine (0,05 %) a été ajouté dans de l'eau éthanol 1/1 (v/v) dans l'échantillon) ;

- La titration a ensuite été faite avec la solution de NaOH 0,1 N (4 g/L) ;
- la titration a été arrêtée lorsque la couleur jaune initiale a viré au rose persistant pendant au moins 30 secondes ;
- La descente de la burette a été lue puis le volume V_{NaOH} a été noté en mL.

➤ *Expression des résultats*

L'acidité titrable (AT) est exprimée en milliéquivalent pour 100 ml d'échantillon ; Elle se calcule suivant la formule :

$$A.T = (V_i * 100) / m_i * f$$

Avec : V_i : volume (mL) de la soude noté au point de virage ; m_i : la prise d'essai et f : facteur de dilution de la soude ($f = 10$ dans ce cas). L'acidité titrable a été multiplié par 90 pour la transformation en équivalent d'acide lactique.

II-2-2-9 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques sont extraits avec l'éthanol 70%, sont ensuite dosés par le réactif de Folin - Ciocalteu (Marigo, 1973).

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{24}$) et d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) qui par réduction lors de l'oxydation des phénols donne un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de Molybdène (MO_8O_{23}). La coloration bleue obtenue possède une absorption maximale à 725 nm elle est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques.

Mode opératoire :

➤ Extraction des composés phénoliques

La sève fraîche (10mL) a été introduite dans une fiole de 50mL et le volume a été complété jusqu'au trait de jauge avec de l'éthanol 70% et nous avons procédé au dosage.

➤ Dosage des composés phénoliques

0.02 mL du surnageant sont introduit dans un tube à essai, puis on y ajoute 1,2 mL d'eau, 0.25 mL de Folin-Ciocalteu. le mélange est agité et laissé au repos ; 1.25 mL de carbonate de sodium est ajouté et le mélange est incubé dans l'obscurité pendant 40 min.

La DO est lue à 725 nm

➤ Préparation de courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été établie suivant le tableau de l'annexe 6.

Expression des résultats

La quantité des composés phénoliques totaux de chaque essai est calculée à l'aide de l'équation de la droite de l'étalonnage de l'acide gallique et la teneur en composés phénoliques totaux est calculée avec la formule suivante :

Teneur en composés phénoliques totaux (CPT) (g/100 g MS) :

$$CPT = \frac{(Q * VT * 100 * 100)}{v * m * MS}$$

Avec, Q: quantité de composés phénoliques dans la prise d'essai (µg) VT: volume final de l'extrait en (mL); v : volume de l'essai (mL); m: masse de l'échantillon (g); MS : matière sèche de la prise d'essai (%).

II-2-3 Préparation des ferments

II-2-3-1 Revivification et multiplication des souches

Pour revivifier et multiplier les cellules probiotiques contenues dans les lyophilisats, 1 g de lyophilisat de chaque souche a été réhydraté comme mentionné par le fabricant. D'abord, la poudre a été réhydratée dans 10 mL de solution saline de dilution (SD) à récupération maximale (0,85 % de NaCl et 0,1 % de peptone dans de l'eau distillée) (Health protection agency, 2004), agitée pendant 10 min. La solution a ensuite été transférée dans 1L de bouillon MRS préalablement préparé et stérilisé. Après une incubation de 48 H à 42 °C le bouillon MRS contenant les multiplicats a été centrifugé à 6500 x g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a par la suite été retiré, le culot lavé dans de la SD sans être resuspendu et ensuite recentrifugé comme précédemment. Le surnageant a été rejeté et le culot a finalement été resuspendu dans 10 mL de SD. Ces 10 mL ont été transférés dans 250 mL de SD pour un total de 250 mL. La concentration en probiotiques de cette solution a été obtenue par des dilutions sériées de facteur 10 dans des tubes contenant 9 ml de SD. Les dilutions ont été étalées sur boîtes de Pétri MRS et incubées pendant 24 H à 42 °C avant de procéder au dénombrement des colonies.

II-2-3-2 Détermination de la concentration cellulaire des multiplicats

La méthode des dilutions ensemencement a été utilisée. Nous avons procédé à des dilutions sériées de facteur 10 dans des tubes contenant 9 ml de SD. Les dilutions ont été étalées sur boîtes de Pétri MRS et incubées 24 H à 42 °C avant de procéder au dénombrement des colonies.

II-2-3-3 Viabilité et courbe de croissance des ferments sur sève de raphia

La viabilité des ferments sur sève de raphia a été étudiée en même temps que les aptitudes acidifiantes des ferments. La méthode de dilution ensemencement a été utilisée pour déterminer la charge microbiennes après 0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 16 et 24 H

II-2-4 Aptitudes des ferments

II-2-4-1 Aptitude acidifiante

La mesure de l'activité acidifiante a consisté à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acide lactique produit. Chacun des deux ferments a été ensemencé dans 40 mL de sève contenue dans des flacons au taux de 5 %. L'acidité a été faite en mesurant simultanément le pH et l'acidité lactique comme décrit précédemment sur la sève brute.

II-2-4-2 Résistance aux antibiotiques

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide décrite par **Idoui et al. (2007)** a été appliquée : chaque inoculum bactérien a servi pour inonder la surface de la gélose MRS. On a laissé les boîtes sécher à température de laboratoire. Les disques antibiotiques ont été par la suite déposés en surface de la gélose.

La résistance des ferments a été testée contre dix antibiotiques à savoir : Erythromycine; Chloramphénicol ; Tétracycline ; Amoxicilline ; Streptomycine ; Cefixime ; Ampicilline ; Oxolinic ; penicilline et sulfonamides.. Après incubation à 42 °C pendant 24 H, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

II-2-4-3 Aptitudes antagonistes

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des ferments étudiés vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'est agi de quatre souches : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.. La méthode des disques décrite par **Tadesse et al. (2004)** a été appliquée : elle consiste à inonder en surface le milieu Mueller - Hinton par

la souche indicatrice. Après incubation pendant 30 min à 37 °C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) sont déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10 µL d'une culture jeune d'un ferment. Les boîtes ont été séchées à température ambiante puis incubées à 4 °C pendant 4 H, par la suite incubées à 37 °C pendant 24 H. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

II-2-5 procédé de production de la boisson probiotique

La production de la boisson probiotique de sève de raphia s'est faite exclusivement à l'aide de la sève fraîche. Les différentes étapes nécessaires à son obtention sont consignées dans la figure 9.

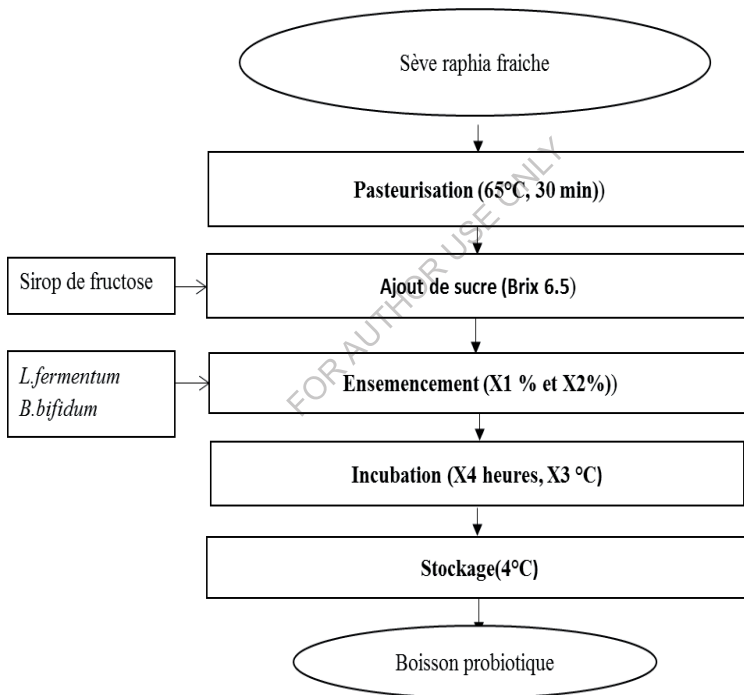


Figure 9: Procédé de production de la boisson probiotique de sève de Raphia lactofermentée.

II-2-6-Modélisation

Les facteurs choisis sont ceux qui influenceraient les caractéristiques physicochimiques de la boisson obtenue. Les facteurs retenus sont donc : le taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (x_1), le taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (x_2), la température de fermentation (x_3) et temps de fermentation (x_4). Le plan d'expérience de Box-Benkhen à 4 facteurs a été utilisé pour l'exécution des manipulations. Les facteurs retenus conduisent au plan d'expérience consigné dans la matrice M (annexe 6). Ces facteurs ont été retenus du fait de leur importance tant sur le plan microbiologique que sur le plan physicochimique. En effet, les taux d'ensemencement sont des critères très importants qui définissent en partie la charge en probiotiques obtenue à la fin de la fermentation; la température permettrait quant à elle de faciliter la fermentation après avoir trouvé un juste équilibre entre les températures optimales de croissance des deux ferments; le taux d'ensemencement joue un rôle primordial dans la mesure où celui-ci définirait en majeure partie les caractéristiques physicochimiques de la boisson car un temps plus ou moins prolongé impliquerait une fermentation prolongée et par conséquent une dégradation prolongée des substrats (sucres, protéines...) présents dans la sève.

Les modèles mathématiques obtenus tiennent compte des variables codées. Il s'agit des modèles mathématiques polynomiaux du type quadratique complet prenant en compte les actions du premier degré (x_1, x_2, x_3 et x_4), du second degré (x_1^2, x_2^2, x_3^2 et x_4^2) et avec interactions ($x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4$ et x_3x_4). Ces facteurs sont statistiquement considérés significatifs si la probabilité (p) est $\leq 0,2$.

Les réponses qui ont été mesurées sont : le pH, le Brix, la charge en probiotique, la teneur en sucres réducteurs, l'acidité lactique, la teneur en protéines solubles, les diamètres d'inhibition contre 4 souches pathogènes indicatrices (*B.Cereus*; *L.Monocytogènes*; *E.Coli*; *Salmonella spp*).

Une opération de transformation des variables codées (varie entre [-1 ;1]) en variables réelles (taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* [0 ;10]%, taux d'ensemencement de *Lactobacillus* [0 ;10] %, Température [37 ;42] °C) et temps d'incubation [2 ;48] H) est effectuée pour des besoins de manipulations. Cette opération permet de rendre comparables les effets des variables réelles, qui ne sont pas forcément exprimés dans les mêmes unités. La transformation la plus utilisée est :

$$x_j = \frac{U_j - U_j^0}{\Delta U_j}$$

Avec :

x_j = valeur de la variable codée j

U_j = valeur de la variable naturelle j

U_{j0} = valeur de la variable naturelle j au centre du domaine d'étude.

ΔU_j est appelé « pas » de variation.

Et ;

$$U_j^0 = \frac{U_j^{max} + U_j^{min}}{2}$$

Le bilan des intervalles de chaque facteur est consigné dans le tableau 5 :

Tableau 5: Intervalles de variation de chaque facteur

Variable	Code de variable	-1	0	+1
Température (°C)	X1	37,0	39,5	42,0
Temps d'incubation(H)	X2	2	25	48
Taux d'ensemencement Lb (%)	X3	0	5	10
Taux d'ensemencement Bif (%)	X4	0	5	10

Après le choix et la conception du plan d'expérience (celui de Box-Benken pour ce qui nous concerne), l'équation du modèle a été définie et des coefficients de l'équation du modèle déterminés. Le modèle utilisé dans la méthode des surfaces de réponses est généralement une équation quadratique de la forme:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$$

Les coefficients du modèle ont été obtenus grâce au logiciel Minitab version 18 (Minitab, Coventry, UK.). Ce logiciel nous a permis de faire une analyse statistique du modèle. Les graphes quant à eux ont été tracés grâce au logiciel Sigmaplot version 12.5 (Systat Software, Inc., San Jose, USA).

La représentativité du modèle passe par une analyse statistique dont le but est de valider le modèle obtenu. Après que les coefficients de régression aient été obtenus, la réponse théorique pourrait être facilement calculée en utilisant l'équation du modèle. Habituellement, le comportement du système est inconnu; ainsi, on doit vérifier si les modèles s'ajustent bien aux données expérimentales. Pour la vérification de l'adéquation du modèle, plusieurs techniques sont employées à savoir:

- L'AADM (analyse absolu des déviations moyennes) dont la valeur doit tendre vers 0. Elle est donnée par la relation :

$$AADM = \frac{\sum_{i=1}^p \log \left(\frac{Y_{i,cal} - Y_{i,exp}}{Y_{i,exp}} \right)}{p}$$

- Le B_f (facteur de biais) et l' A_f (facteur d'exactitude) dont les valeurs doivent être comprises entre 0,75 et 1,25 et exprimés comme suit :

$$B_f = 10^{\frac{1}{p}} \sum_{i=1}^p \log \left(\frac{Y_{i,cal}}{Y_{i,exp}} \right)$$

$$A_f = 10^{\frac{1}{p}} \sum_{i=1}^p \log \left(\frac{Y_{i,cal}}{Y_{i,exp}} \right)$$

Où $y_i \text{ exp}$ et $y_i \text{ cal}$ sont respectivement les réponses expérimentales et calculées, p est le nombre d'expériences effectuées.

II-2-7 Optimisation

Le matériel a été constitué essentiellement des logiciels : Scientific WorkPlace et Minitab 18. Logiciels qui sont spécialisés dans les calculs et les opérations mathématiques. On peut également citer le logiciel Sigmaplot 12.5 qui a permis de tracer les graphes et de faire des superpositions de ceux-ci.

Pour arriver à l'optimisation d'une réponse ou de l'ensemble des réponses, il a été question dans un premier temps de fixer les conditions optimales pour chaque réponse puis d'utiliser le logiciel Minitab© version 18. En effet ce logiciel a permis d'obtenir l'optimum (maximum ou minimum) théorique.

II-2-7 Analyse sensorielle

L'acceptabilité de la boisson par le consommateur a été mesurée à travers l'épreuve hédonique. L'analyse sensorielle a été effectuée sur un panel constitué de 20 personnes. Deux boissons dont la boisson optimale et la sève brute ont été analysées et il a été question d'apprécier le goût, la flaveur, l'acidité et l'acceptabilité générale sur une échelle graduée de 1 à 9 tel que l'indique l'annexe 7.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-1 Caractéristiques physicochimiques de la sève de raphia

La caractérisation physicochimique de la sève de raphia fraîche dont les résultats sont consignés dans le tableau 6 a montré que celle-ci contient 3,801%±0,037 de matière sèche, 7,044±0,172 de cendres par 100g de matière sèche, 10,789±1,388g de sucres réducteurs par Litre, une acidité titrable de 4.44 équivalent gramme d'acide lactique par L, un p^H de 4.12, 2,91±0,94 g de composés phénoliques totaux par L, une masse volumique de 1.158g/L et un Brix de 4.2.

Tableau 6: Caractéristiques physicochimiques de la sève de Raphia

Caractéristiques	Sève de Raphia
Teneur en matière sèche (%)	3,80±0,037
Teneur en cendres (% de MS)	7,04±0,172
Teneur en sucres (g/L)	10,789±1,388
Teneur en protéines solubles (mg/ml)	8,70±0,07
°Brix	4,2±0.0
Acidité titrable (eq g d'acide lactique/L)	4,440±0,104
p ^H	4,12±0.0
Composés phénoliques totaux(mg/ml)	2,91±0,94
Masse volumique(g/L)	1,158±0,000
Protéines (mg/L)	870±0.07

La teneur en matière sèche (3,801%±0,037) élevée pour une boisson liquide nous montre que la sève de raphia contient plus de 3% d'éléments organiques ; comparée à la sève fraîche de vin de palme, cette teneur en matière sèche est relativement faible : En effet, des études menées par Bergeret et Masseyeif,(1957) ont montré que le vin de palme frais contenait près de 10.82% de matière sèche. Par ailleurs la masse volumique de la sève (1,158±0,000 g/L) semble confirmer la présence d'éléments autres que l'eau dans la sève car si cette dernière n'était faite que d'eau, sa masse volumique aurait été très proche de 1.

D'autre part, la teneur en cendres ($7,044\% \pm 0,172\%$ g de matière sèche) indique la présence dans la sève d'éléments minéraux. Ceci s'expliquerait par le fait que la sève de raphia n'est rien d'autre que la sève élaborée du palmier Raphia ; en effet les minéraux sont généralement contenus dans la sève brute mais le palmier Raphia étant une monocotylédone, la sève brute et la sève élaborée sont diffusées dans l'ensemble de l'arbre permettant ainsi d'avoir lors de la cueillette un liquide ayant en même temps des minéraux provenant de la sève brute et des éléments organiques provenant de la sève élaborée.

La teneur en sucres ($10,789 \pm 1,388$ g/L) et le Brix (4,2) sont tous deux des indicateurs de la quantité de sucres présents dans la sève. Ces deux paramètres révèlent que la quantité de sucres présents dans la sève est assez faible pour la production d'une boisson fermentée, ainsi le Brix a été ajusté à 6.5 soit l'équivalent d'une teneur en sucres de 30,24 g/L par ajout de fructose afin de procéder à la fermentation. En effet, une étude similaire diligentée par Lupien-Meilleur (2012) sur la faisabilité d'une boisson probiotique à base de sève d'érable a montré au Québec que les probiotiques utilisés se développaient mieux dans les sèves d'érable dont le Brix était compris entre 6 et 8.

Outre la teneur en sucres, la teneur en protéines solubles (870 ± 0.07) montre que la sève de Raphia contient assez de protéines. En effet, les bactéries lactiques ont besoin de protéines qu'ils transforment en acides aminés pour assurer leur homéostasie et se multiplier (Roudj et al., 2009).

Au regard de toutes ces caractéristiques physicochimiques, la sève de Raphia apparaît comme une bonne matrice pour recevoir des probiotiques ; cependant très peu d'informations ayant été réalisées sur cette sève, il manque cruellement d'informations sur la possibilité qu'il y ait des éléments qui pourraient nuire à la croissance des ferments. Ainsi, à défaut de faire une caractérisation plus poussée il a été impératif de d'étudier au préalable la viabilité des ferments sur la sève de Raphia.

III-2 Courbe de croissance et viabilité des ferments sur sève de Raphia

Les figures 10 et 11 présentent respectivement les courbes de croissance de *L.fermentum* et de *B.bifidum* dans la sève de Raphia. Il ressort de ces courbes que les deux ferments sont viables dans la sève de Raphia. Cependant un temps d'incubation prolongé contribue à la baisse de la quantité de *B.bifidum* tandis que la croissance de *L.fermentum* continue. En effet, ceci s'expliquerait par le fait que *L.fermentum* résisterait mieux à l'acidification liée à la fermentation par rapport à *B.bifidum* du fait de leur bagage génétique différent. Par ailleurs on pourrait également évoquer la production de composés antimicrobiens par ces deux ferments pour justifier ces variations ; toutefois, l'hypothèse des composés antimicrobiens ne saurait être détaillée d'avantage ici car constitue une partie à part entière dans le cadre des résultats des plans d'expérience.

Il est à noter que les aliments constituent la forme la plus appréciée et la plus répandue pour la consommation de probiotiques. Pour ces aliments, dont la quantité et la variété explosent sur les marchés, le défi réside principalement dans le maintien de la survie des microorganismes et de leurs caractéristiques probiotiques. En effet, entre la fabrication et la consommation d'un aliment probiotique, de nombreux facteurs peuvent affecter la viabilité des probiotiques et doivent être pris en compte (d'où la caractérisation physicochimique préalable de la sève de Raphia). La stabilité du probiotique dépend grandement des caractéristiques physico-chimiques de son environnement (Champagne et al., 2005; Mattila-Sandholm et al., 2002; Sanders et Huis in't Veld, 1999).

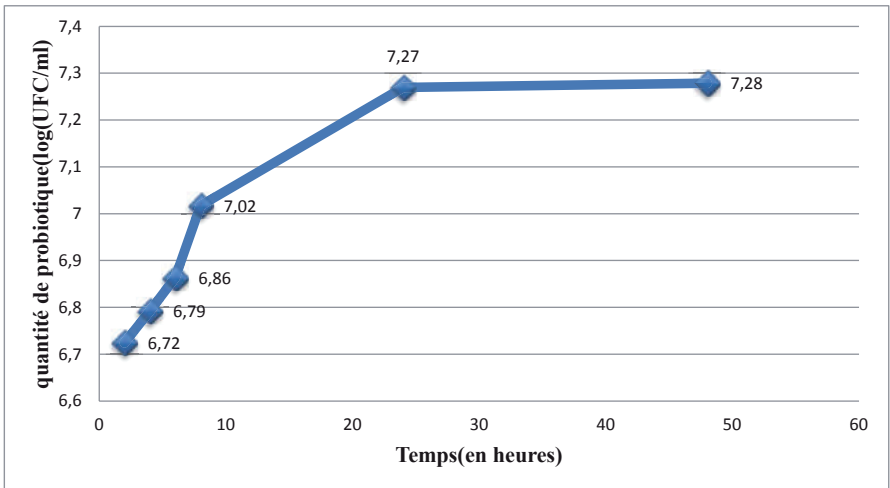


Figure 10: Viabilité et courbe de croissance de *L. fermentum* sur sève de Raphia

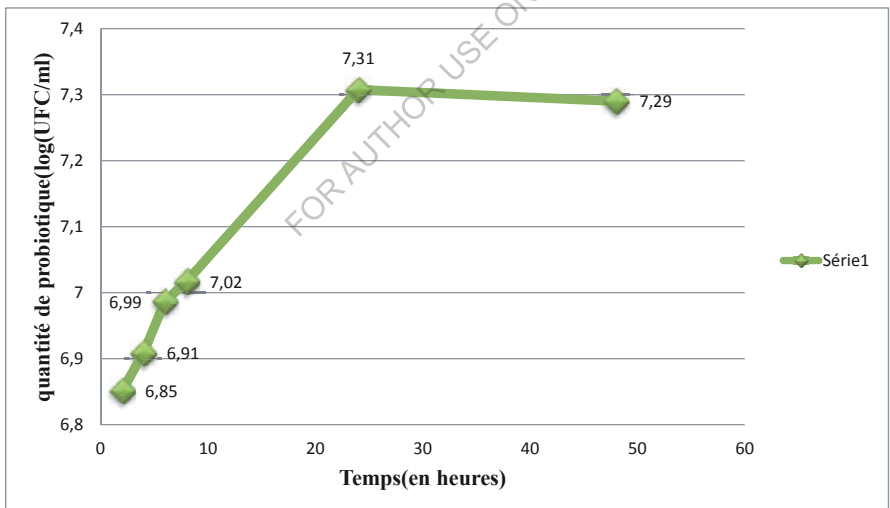


Figure 11: Viabilité et courbe de croissance de *B. bifidum* sur sève de Raphia

III-3 Aptitudes des ferments

III-3-1 Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut être définie comme la capacité des bactéries et d'autres micro-organismes à résister à un antibiotique auquel elles étaient une fois sensible (Levy et Marshall, 2004). Les résultats de l'étude de la résistance aux antibiotiques sont consignés dans le tableau 7. On remarque que *L.fermentum* et *B.bifidum* présentent approximativement les mêmes caractères de résistance face à la céfixime et à l'amoxicilline ; cependant *L.fermentum* présente un caractère de résistance plus élevé à tous les autres antibiotiques utilisés par rapport à *B.bifidum*. Toutefois, la tétracycline semble avoir un effet sur les deux souches bien que *L.fermentum* en soit résistant contrairement à *B.bifidum* qui en est sensible. Cette aptitude à résister aux antibiotiques ne présente aucun danger. Cependant, elle peut constituer un véritable risque lorsqu'elle est transférée à des espèces bactériennes pathogènes qui peuvent compliquer le traitement d'une maladie ou d'une infection (Bernardeau et al., 2008). Bien que les *Lactobacillus* soient globalement considérés comme sécuritaires (Gibson et Roberfroind, 1995; Holzapfel et al., 2001; Reid et Hammond, 2005; Sanders et Huis in't Veld, 1999), cette étude de la résistance aux antibiotiques pourrait permettre une bonne orientation dans le choix d'un antibiotique dans le cas où ces souches seraient impliquées dans une infection.

Tableau 7: Diamètres d'inhibition de la résistance des ferments aux antibiotiques

Antibiotiques	<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
	Diamètre(mm)	Interprétation	Diamètre(mm)	Interprétation
Erythromycine	0	R***	8,5	R*
Chloramphénicol	0	R***	7	R**
Tétracycline	11	R	15	S
Amoxicilline	6	R**	7	R**
Streptomycine	0	R***	8	R**
Céfixime	8	R**	6,5	R**
Ampicilline	0	R***	7	R**
Oxolinic	0	R***	9	R*
penicilline	0	R***	8,5	R*
sulfonamides	0	R***	8	R**

Avec R***= Hautement Résistant, R** et R*= Résistant ; S* et S** : Sensible

III-3-2 Aptitude acidifiante

D'après Chamba (1990), une souche n'est acidifiante que si la diminution de pH égale au moins 0,5 unité en quatre heures. A cet égard, les ferments ne sont pas acidifiants vis-à-vis de la sève de raphia car au bout de 4H, bien que contribuant à diminuer le pH et à augmenter l'acidité lactique, les variations ne sont pas significatives. Ainsi, pour avoir une boisson davantage acide, il faudrait un temps de fermentation plus poussé.

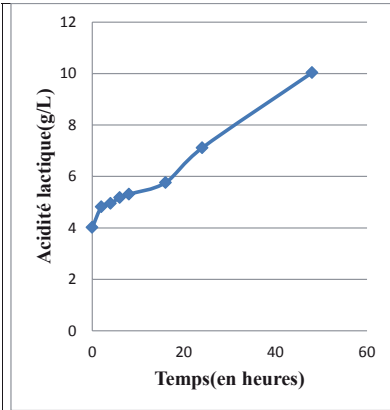


Figure 12: Evolution de l'acidité de la sève fermentée à *B.bifidum*(5%)

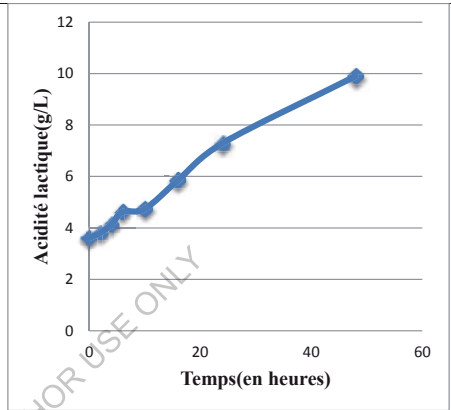


Figure 13: Evolution de l'acidité de la sève fermentée à *L.fermentum*(5%)

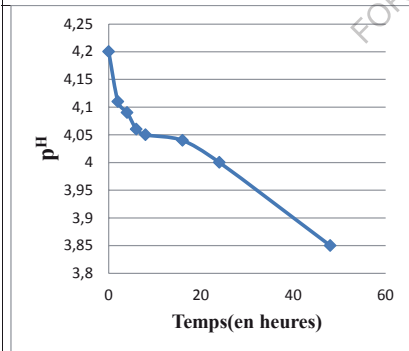


Figure 14: Evolution du pH de la sève fermentée à *B.bifidum*(5%)

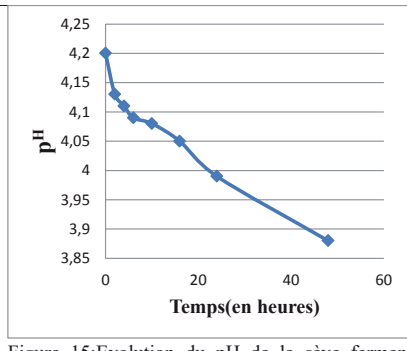


Figure 15: Evolution du pH de la sève fermentée à *L.fermentum*(5%)

III-4 Modélisation de l'impact des facteurs (taux d'ensemencement ; température et temps d'incubation) sur les paramètres physicochimiques de la boisson probiotique.

Le tableau 8 présente les résultats des analyses physico-chimiques des boissons probiotiques après expérimentation. Ces résultats ont fait l'objet de modélisations mathématiques statistiques. Les caractéristiques physico-chimiques tels que le pH, le Brix, la teneur en sucres réducteurs (g/L) la teneur en protéines solubles (mg/L), l'acidité titrable ont été suivis.

Tableau 8: Résultats des analyses physicochimiques

Essai	FACTEURS				Caractéristiques physicochimiques					
	X1	X2	X3	X4	pH	Brix	Acide lactique(g/L)	Sucres(g/L)	Protéines(mg/L)	
1	-1	-1	0	0	4,2	6,5	4,44	30,0523	868,3560	
2	1	-1	0	0	3,79	5,3	5,79	20,6841	504,3950	
3	-1	1	0	0	3,98	5,6	5,43	19,4641	518,1294	
4	1	1	0	0	3,79	5,2	5,73	14,8453	391,0864	
5	0	0	-1	-1	4,11	6,1	5,22	23,5599	562,7661	
6	0	0	1	-1	4,18	6,4	4,74	23,3856	586,8013	
7	0	0	-1	1	3,63	4,2	7,53	8,0044	336,1489	
8	0	0	1	1	3,7	4,8	7,65	8,7451	339,5825	
9	-1	0	0	-1	4,16	6,3	5,01	29,0937	782,5161	
10	1	0	0	-1	4,1	5,9	5,475	21,2070	545,5981	
11	-1	0	0	1	3,8	5,3	6,36	9,9651	562,7661	
12	1	0	0	1	3,58	4	7,92	6,8715	212,5395	
13	0	-1	-1	0	3,78	5,3	5,79	18,4183	562,7661	
14	0	1	-1	0	3,74	5,2	5,94	15,7168	411,6880	
15	0	-1	1	0	3,92	5,5	5,55	20,6841	586,8013	
16	0	1	1	0	3,73	5,1	6,21	16,1525	459,7583	
17	-1	0	-1	0	3,89	5,5	5,7	18,3747	545,5981	
18	1	0	-1	0	3,72	5	6,3	14,8453	607,4028	
19	-1	0	1	0	3,96	5,9	5,49	18,5490	607,4028	
20	1	0	1	0	3,7	4,8	6,45	16,4575	439,1567	
21	0	-1	0	-1	4,18	6,5	4,74	29,6166	607,4028	
22	0	1	0	-1	4,1	6	5,31	20,6841	562,7661	
23	0	-1	0	1	3,87	5,4	6,33	10,2266	377,3520	
24	0	1	0	1	3,68	4,6	7,17	6,4357	315,5473	
25	0	0	0	0	3,75	5,1	5,82	13,8431	518,1294	
26	0	0	0	0	3,8	5,2	5,79	14,1046	494,0942	
27	0	0	0	0	3,79	5,4	5,76	14,3660	490,6606	
28	0	0	0	0	3,85	5,2	5,97	13,7560	487,2270	

X1=Taux d'ensemencement de Bifidobacterium ;X2=Taux d'ensemencement de Lactobacillus ; X3= Température d'incubation; X4= temps d'incubation.

III-4-1 Modélisation de la teneur en sucres réducteurs

Le modèle mathématique obtenu se présente comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Sucres(g/L)} = & 14,017 - 2,549 x_1 - 3,032 x_2 + 0,421 x_3 - 8,108 x_4 + 2,958 x_1 * x_1 \\ & + 3,279 x_2 * x_2 + 0,768 x_3 * x_3 + 0,131 x_4 * x_4 + 1,187 x_1 * x_2 + 0,359 x_1 * x_3 \\ & + 1,198 x_1 * x_4 - 0,458 x_2 * x_3 + 1,285 x_2 * x_4 + 0,229 x_3 * x_4 \end{aligned}$$

Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0,96 Ce coefficient de détermination, combinée à l'AADM de 0,023, au B_f de 1,00 et A_f de 1,023 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi de la teneur en sucres..

Le tableau 9 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur la teneur en sucres réducteurs.

Tableau 9: Analyse de variance pour le suivi de la teneur en sucres réducteurs

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de P
Constant	14,017	17,07	0,000
x1	-2,549	-5,38	0,000
x2	-3,032	-6,39	0,000
x3	0,421	0,89	0,391
x4	-8,108	-17,10	0,000
x1*x1	2,958	4,41	0,001
x2*x2	3,279	4,89	0,000
x3*x3	0,768	1,15	0,273
x4*x4	0,131	0,19	0,848
x1*x2	1,187	1,45	0,172
x1*x3	0,359	0,44	0,669
x1*x4	1,198	1,46	0,168
x2*x3	-0,458	-0,56	0,587
x2*x4	1,285	1,57	0,142
x3*x4	0,229	0,28	0,785

Les facteurs X1, X2 et X4 ont un impact significatif sur la teneur en sucres avec des probabilités de 0,000 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) sur la teneur en sucres

L'influence du taux d'ensemencement de *B.bifidum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 16.

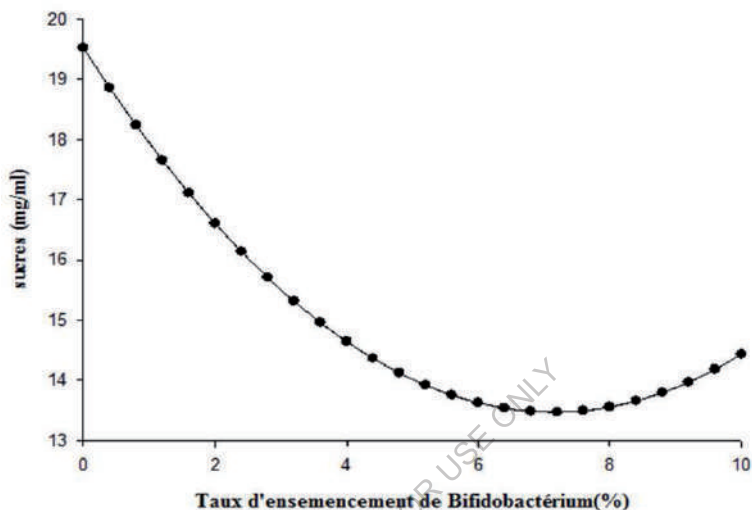


Figure 16: Effet du taux d'ensemencement de Bifidobacterium sur la teneur en sucres

De cette figure, on observe que la teneur en sucres solubles décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 9) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *B.bifidum*. En effet, on part d'une teneur en sucres de 19,5 mg/mL (taux d'ensemencement à 0%) à une teneur en sucres de 13,5 mg/mL (taux d'ensemencement à 7%). Ceci s'expliquerait par la fermentation des sucres présents dans le milieu par la bactérie. En effet celle-ci a besoin pour se multiplier et assurer sa survie de dégrader les sucres présents dans le milieu notamment en utilisant la voie d'Emden Meyerhof Parnas communément appelée glycolyse.

Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en sucres solubles de 13,5 mg/mL (T=7 %) à 14,5mg/mL (T=10%) pourrait s'expliquer par la production par la bactérie d'exopolysaccharides(EPS). En effet, certaines bactéries lactiques sont capable de produire des EPS dans leur environnement qui présentent des effets fonctionnels et bénéfiques pour la santé (Patricia et *al.*, 2002; Welman et Maddox, 2003).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur la teneur en sucres

L'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39.5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 17.

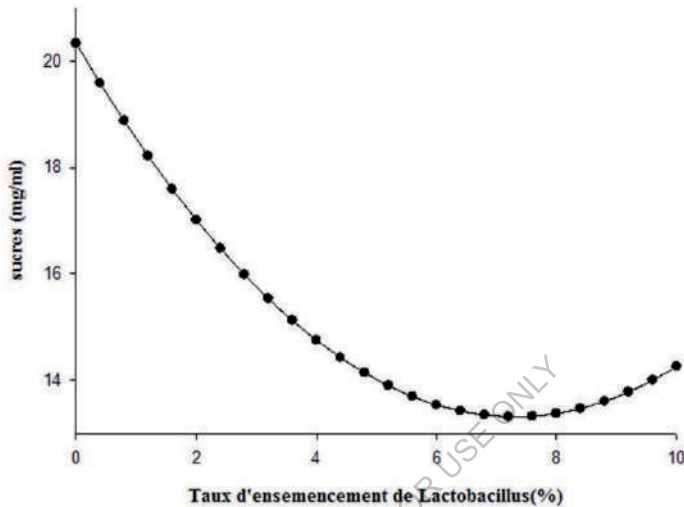


Figure 17: Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur la teneur en sucres

De cette figure, on observe que la teneur en sucres solubles décroît significativement ($p = 0,000$; tableau 9) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *L.fermentum*. En effet, on part d'une teneur en sucres de 20,2 mg/mL (taux d'ensemencement à 0%) à une teneur en sucres de 11,4 mg/mL (taux d'ensemencement à 7,3%) et on observe par la suite une augmentation de la teneur en sucres de 13,5 mg/mL ($T = 7\%$) à 14,5 mg/mL ($T = 10\%$). Ces variations similaires à celles de l'influence de *B.bifidum* ont des explications identiques tant pour la diminution due à la fermentation et sur l'augmentation due à la production d'exopolysaccharides.

❖ Effet du temps d'incubation (X4) sur la teneur en sucres

Après avoir fixé les taux d'ensemencement de *L.fermentum* et *B.bifidum* à 5% et la température à 39,5°C, l'influence du temps d'incubation sur la teneur en sucres est présentée dans la figure 18.

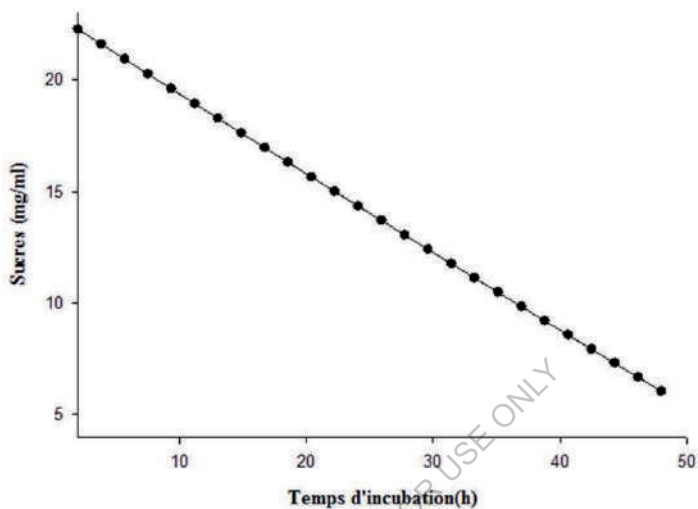


Figure 18: Effet du temps d'incubation sur la teneur en sucres

De cette figure, on observe que la teneur en sucres solubles décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 9) avec le temps. Cette courbe aux allures de droite montre que la diminution de la teneur en sucres est proportionnelle au temps d'incubation. En effet, on part d'une teneur en sucres de 20,9mg/mL ($t=0H$) à une teneur en sucres de 6 mg/mL ($t=48H$). Ceci s'explique par le fait que les deux souches fixées ici à 5% se multiplient et fermentent les sucres présents dans le milieu au fil du temps.

III-4-2 Modélisation du Brix

Le modèle mathématique obtenu se présente comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Brix} = & 5,2250 - 0,4083 x_1 - 0,2333 x_2 + 0,1000 x_3 - 0,7417 x_4 + 0,1167 x_1 * x_1 + 0,2292 x_2 * x_2 \\ & - 0,0708 x_3 * x_3 + 0,1417 x_4 * x_4 + 0,2000 x_1 * x_2 - 0,1500 x_1 * x_3 - 0,2250 x_1 * x_4 \\ & - 0,0750 x_2 * x_3 - 0,0750 x_2 * x_4 + 0,0750 x_3 * x_4 \end{aligned}$$

“ Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0,95. Ce coefficient de détermination, combiné à l'AADM de 0,040, au B_f de 1,001 et A_f de 1,040 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi du Brix..

Le tableau 10 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur le Brix.

Tableau 10:Analyse de variance pour le suivi du Brix

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de p
Constant	5,2250	53,11	0,000
x1	-0,4083	-7,19	0,000
x2	-0,2333	-4,11	0,001
x3	0,1000	1,76	0,102
x4	-0,7417	-13,06	0,000
x1*x1	0,1167	1,45	0,170
x2*x2	0,2292	2,85	0,014
x3*x3	-0,0708	-0,88	0,394
x4*x4	0,1417	1,76	0,101
x1*x2	0,2000	2,03	0,063
x1*x3	-0,1500	-1,52	0,151
x1*x4	-0,2250	-2,29	0,040
x2*x3	-0,0750	-0,76	0,459
x2*x4	-0,0750	-0,76	0,459
x3*x4	0,0750	0,76	0,459

Les facteurs X1, X2 et X4 ont un impact significatif sur le Brix avec des probabilités de 0,000 (<0,1). Les interactions X1X2 et X1X4 sont également significatives avec des probabilités respectives de 0,063 et 0,040 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) sur le Brix

L'influence du taux d'ensemencement de *B.bifidum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5%, la température à 39.5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 19.

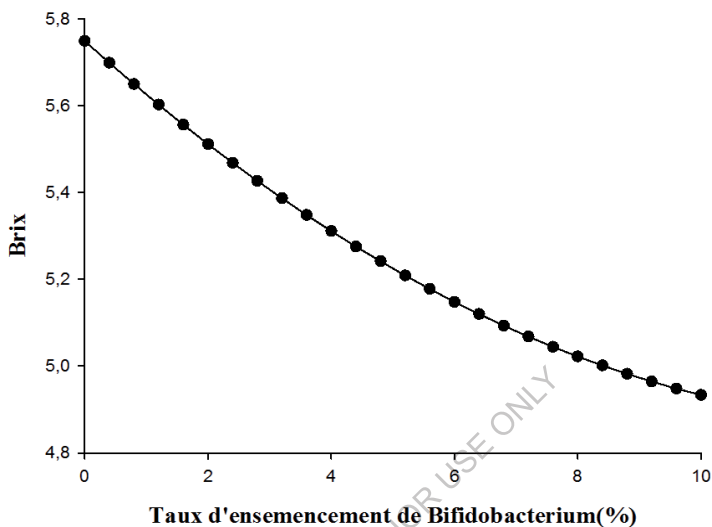


Figure 19: Effet du taux d'ensemencement de Bifidobacterium sur le Brix

De cette figure, on observe que le Brix décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 10) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *B.bifidum*. En effet, on part d'un Brix de 5,75 (taux d'ensemencement à 0%) à un Brix de 4,5 (taux d'ensemencement à 10%). Tout comme dans le cas des sucres réducteurs, ceci s'expliquerait par la fermentation des sucres présents dans le milieu par le ferment lactique. En effet celle-ci a besoin pour se multiplier et assurer sa survie de dégrader les nutriments présents dans le milieu (principalement les sucres) notamment en utilisant notamment la voie d'Emden Meyerhof Parnas communément appelée glycolyse chez les eucaryotes.

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur le Brix

L'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39.5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 20.

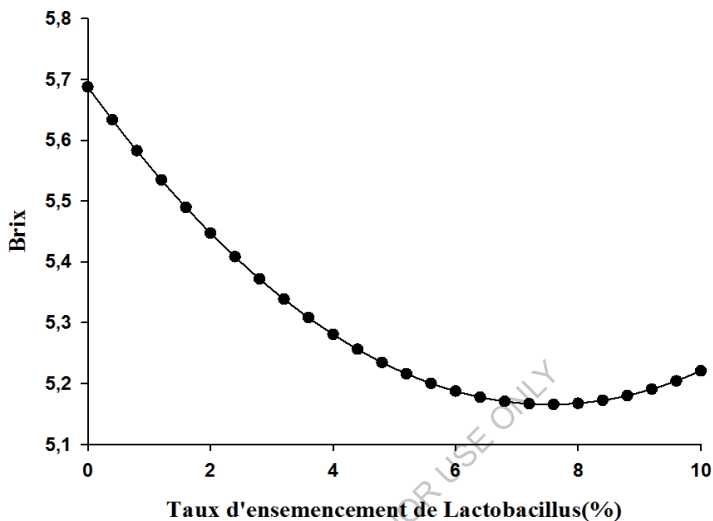


Figure 20: Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur le Brix

On observe de celle-ci que le Brix décroît significativement ($p = 0,001$: tableau 10) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *L.fermentum*. En effet, on part d'un Brix de 5,7 (taux d'ensemencement à 0%) à un Brix de 5,15 (taux d'ensemencement à 7,2%). Puis on observe une augmentation du Brix de 5,15 (T=7,2%) à 5,2 (T=10%). Bien que les explications de ces variations semblent similaires à celle observée dans le cas des sucres réducteurs, il est important de souligner ici que la variation du Brix sous l'influence de *L.fermentum* semble être très légère par rapport à celle de *B.bifidum* ceci étant probablement dû à la production d'EPS par *L.fermentum* viendrait compenser la baisse des sucres fermentescibles présent dans la sève.

❖ Effet du temps d'incubation (X4) sur le Brix

Après avoir fixé les taux d'ensemencement de *L.fermentum* et *B.bifidum* à 5% et la température à 39.5°C, l'influence du temps d'incubation sur le Brix a été étudiée et représentée dans la figure 21.

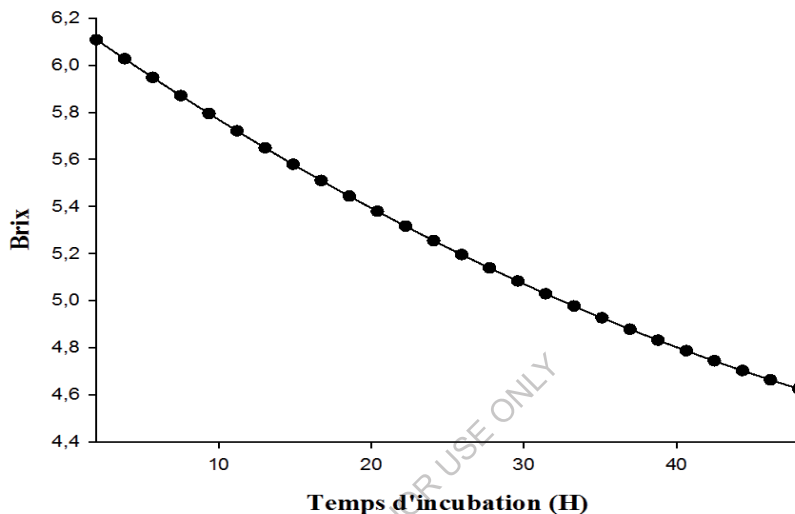


Figure 21: Effet du temps d'incubation sur le Brix

De cette figure, on observe que le Brix décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 10) avec le temps. Cette courbe aux allures de droite montre tout comme dans le cadre des sucres solubles que la diminution du Brix serait proportionnelle au temps d'incubation. En effet, on part d'un Brix de 6,1 ($t=0H$) à un Brix de 4,6 ($t=48H$). Ceci s'explique également par le fait que les deux souches fixées ici à 5% se multiplient et fermentent les sucres présents dans le milieu au fil du temps.

❖ **Effet de l'interaction entre les taux d'ensemencement de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sur le Brix**

L'effet de l'interaction entre *L.fermentum* et *B.bifidum* sur le Brix a été étudié et représentée à la figure 22, ceci après avoir fixé le temps d'incubation et le taux d'ensemencement à leurs valeurs centrales qui sont respectivement de 25H et 39,5°C.

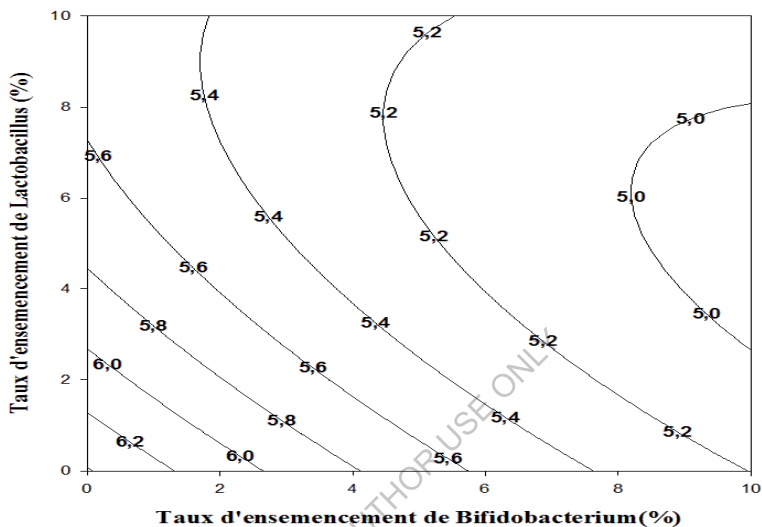


Figure 22:Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur le Brix

Les lignes de contour de ce graphe nous montrent que les deux ferments combinés contribuent significativement à diminuer le Brix (avec une probabilité 0.063 :tableau 10). Cette diminution serait corrélée à l'augmentation des taux d'ensemencement des deux ferments. La diminution progressive indiquerait ici que la voie de production des EPS est négligeable face à la voie fermentaire. Ainsi, Pour avoir une boisson avec un Brix moyen, il faudrait donc trouver un compromis entre ces deux facteurs en les couplant à un temps de fermentation approprié.

❖ **Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement(X1) de Bifidobacterium et le temps d'incubation (X4) sur le Brix**

De façon générale, l'association du taux d'ensemencement et du temps d'incubation joue un rôle significatif dans le cadre des fermentations ; cependant on observe ici(tableau 10) que l'interaction entre le taux d'ensemencement de *L.fermentum* et le temps n'a pas une influence significative sur le Brix($P=0.459$: tableau 10) tandis celle du taux d'ensemencement de *B.bifidum* et le temps d'incubation l'est ($P=0.040$: tableau 10). Ce résultat est tout à fait en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de l'influence individuelle de *L.fermentum* sur le Brix montrant que ce ferment tend à vouloir compenser la chute des sucres fermentescibles par la production des macromolécules de sucres que sont les exopolysaccharides. Ainsi après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* et la température d'incubation à leurs valeurs centrales qui sont respectivement 5% et 39.5°C l'influence de l'interaction entre le taux d'ensemencement de *B.bifidum* et le temps a été représenté dans la figure 23.

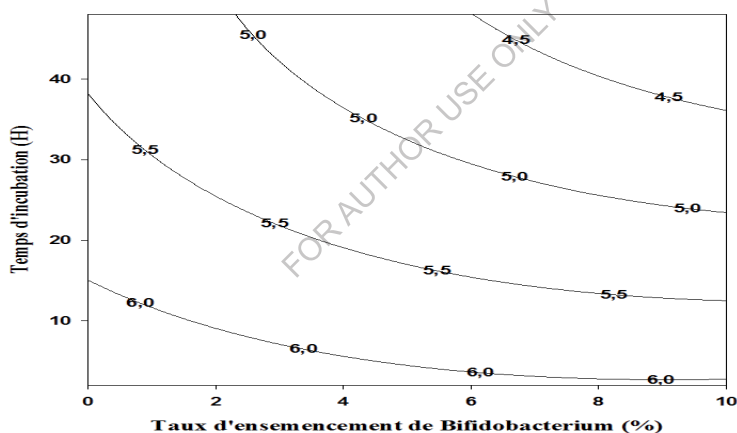


Figure 23:Influence de l'interaction entre le taux d'ensemencement de Bifidobacterium et le temps d'incubation sur le Brix.

Il ressort de cette figure que l'augmentation du taux d'ensemencement associée à l'augmentation du temps d'incubation contribuent à diminuer le Brix. L'explication de cette variation étant similaire à celle évoquée précédemment dans e l'étude de l'influence du temps d'incubation sur ce paramètre.

III-4-3 Modélisation des protéines solubles

Le modèle mathématique obtenu se présente comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Protéines (mg/mL)} = & 497,5 - 98,7 x_1 - 70,7 x_2 - 0,6 x_3 - 125,3 x_4 + 62,1 x_1 * x_1 + 9,7 x_2 * x_2 \\ & - 5,3 x_3 * x_3 - 37,1 x_4 * x_4 + 59,2 x_1 * x_2 - 57,5 x_1 * x_3 - 28,3 x_1 * x_4 \\ & + 6,0 x_2 * x_3 - 4,3 x_2 * x_4 - 5,2 x_3 * x_4 \end{aligned}$$

“ Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0,88 .Ce coefficient de détermination, combinée à l’AADM de 0,073, au B_f de 1,004 et A_f de 1,074 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi de la teneur protéines solubles..

Le tableau 11 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur la teneur en protéines solubles.

Tableau 11:Analyse de variance pour le suivi de la teneur en protéines solubles

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de P
Constant	497,5	15,37	0,000
x1	-98,7	-5,28	0,000
x2	-70,7	-3,78	0,002
x3	-0,6	-0,03	0,976
x4	-125,3	-6,71	0,000
x1*x1	62,1	2,35	0,035
x2*x2	9,7	0,37	0,719
x3*x3	-5,3	-0,20	0,844
x4*x4	-37,1	-1,40	0,184
x1*x2	59,2	1,83	0,090
x1*x3	-57,5	-1,78	0,099
x1*x4	-28,3	-0,88	0,397
x2*x3	6,0	0,19	0,856
x2*x4	-4,3	-0,13	0,897
x3*x4	-5,2	-0,16	0,876

Les facteurs X1, X2 et X4 ont un impact significatif sur ce paramètre avec des probabilités de 0,00 (<0,1). Les interactions X1X2 et X1X3 sont également significatives avec des probabilités respectives de 0,090 et 0,099 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) sur les protéines solubles

L'influence du taux d'ensemencement de *B.bifidum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 24.

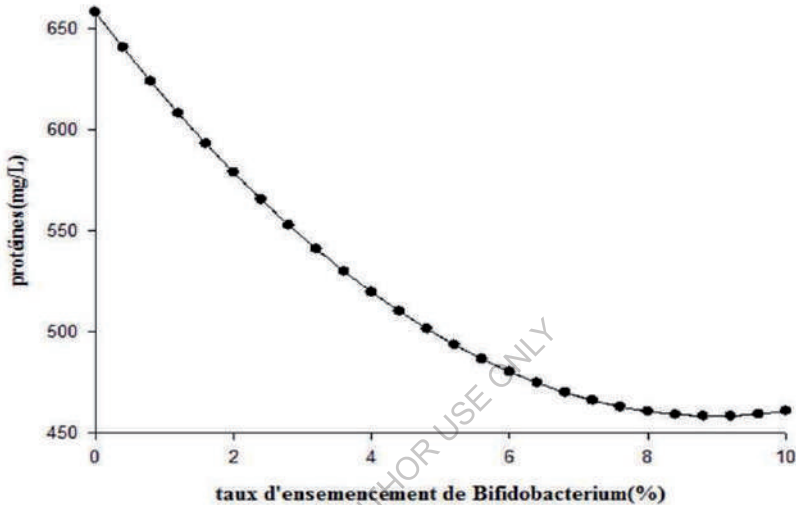


Figure 24: Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* sur la teneur en protéines solubles.

On observe que la teneur en protéines décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 11) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *B.bifidum*. En effet, on part d'une teneur en protéines de 651 mg/L (taux d'ensemencement à 0%) à une teneur en protéines de 452 mg/L (à partir d'un taux d'ensemencement de 8%). Ceci s'expliquerait par la dégradation des protéines présentes dans le milieu par *B.bifidum* en vue d'assurer sa croissance et sa multiplication. En effet, La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines et les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée (Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur les protéines solubles

L'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 25.

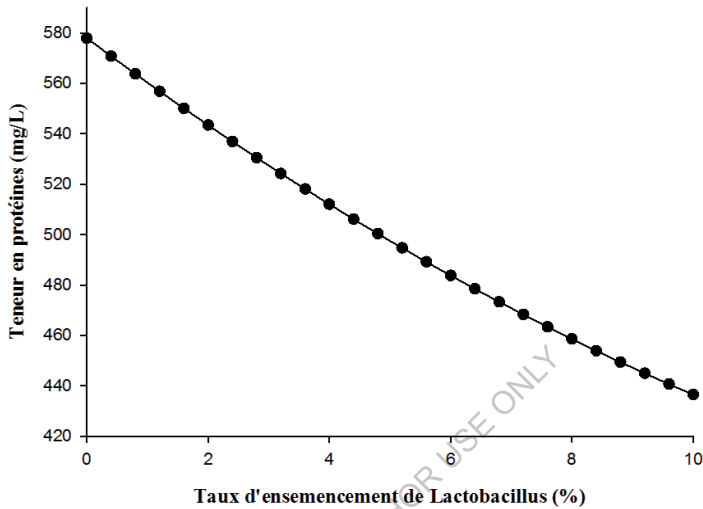


Figure 25: Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur la teneur en protéines.

On note ici que la teneur en protéines décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 11) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *L.fermentum*. En effet, on part d'une teneur en protéines de 580 mg/L (taux d'ensemencement à 0%) à une teneur en protéines de 440 mg/L (taux d'ensemencement à 10%) . Cette courbe aux allures de droite montre que la diminution de la teneur en protéines solubles est fortement corrélée au taux d'ensemencement de *L.fermentum* ; cependant on constate que *B.bifidum* contribue d'avantage à la diminution de la teneur en protéines par rapport à *L.fermentum*, ceci étant probablement dû à des différences liées à leur bagage enzymatique. Toutefois, ces variations similaires à celles observées lors de l'étude de l'influence de *B.bifidum* sur la teneur en protéines pourraient s'expliquer de la même manière.

❖ Effet du temps d'incubation (X4) sur les protéines solubles

Après avoir fixé les taux d'ensemencement de *L.fermentum* et *B.bifidum* à 5% et la température à 39,5°C, l'influence du temps d'incubation sur la teneur en sucres est présentée dans la figure 26.

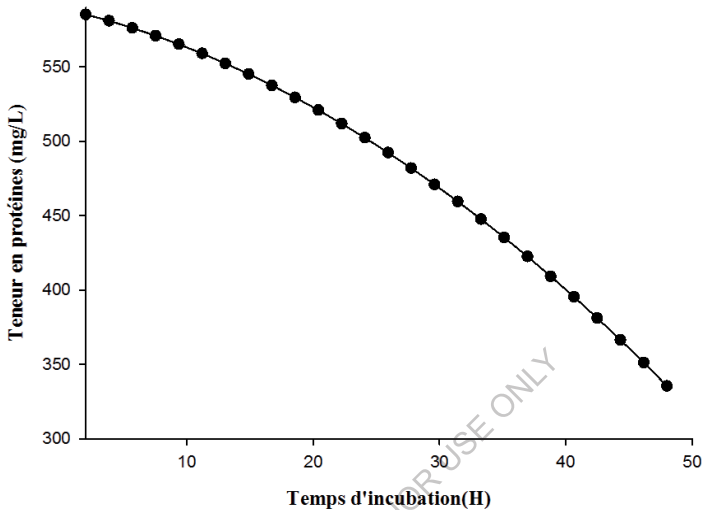


Figure 26: Effet du temps d'incubation sur la teneur en protéines

De cette figure, on remarque que la teneur en protéines décroît significativement ($p = 0,000$; tableau 11) avec le temps. En effet, on part d'une teneur en sucres de 575 mg/L ($t=0H$) à une teneur en sucres de 325mg/L($t=48H$). Ceci serait dû à l'utilisation des protéines par les deux souches fixées à 5%. En effet les processus physiologiques des ferments impliquant leur multiplication sont des phénomènes qui évoluent avec le temps. En d'autres termes, la diminution de la teneur en protéines serait due à l'hydrolyse de ces dernières au fil du temps par les enzymes protéolytiques de *B.bifidum* et *L.fermentum* afin d'avoir assez d'acides aminés qui leur permettraient d'assurer leur croissance et leur multiplication.

❖ Effet de l'interaction entre les taux d'ensemencement de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sur les protéines solubles

L'effet de l'interaction entre *L.fermentum* et *B.bifidum* sur la teneur en protéines a été étudié et représenté dans la figure 27, ceci après avoir fixé le temps d'incubation et le taux d'ensemencement à respectivement à 25H et 39,5°C.

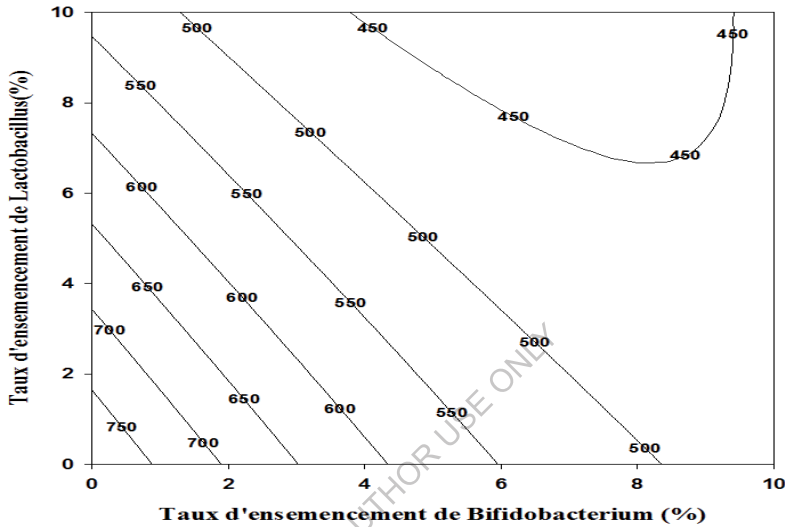


Figure 27: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur la teneur en protéines

Ce contour plot nous montre que les deux ferments mis ensemble contribuent significativement à diminuer la teneur en protéines(avec une probabilité 0,089 :tableau 11). En effet l'augmentation des taux d'ensemencement contribue à diminuer de façon considérable ce paramètre. Ce résultat rejoint ceux observés sur l'influence des ferments individuels sur la teneur en protéines où il a été démontré que ces derniers hydrolysent les protéines pour avoir des acides aminés nécessaire à leur multiplication et donc à leur survie.

❖ Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) et la température d'incubation (X3) sur les protéines solubles

La température d'incubation est un paramètre très important pour assurer la croissance optimale des microorganismes (Killer et al. 2010). Ainsi, l'étude de l'interaction entre le taux d'ensemencement de *B.bifidum* et la température d'incubation après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5% et le temps d'incubation à 25H est présenté dans la figure 28.

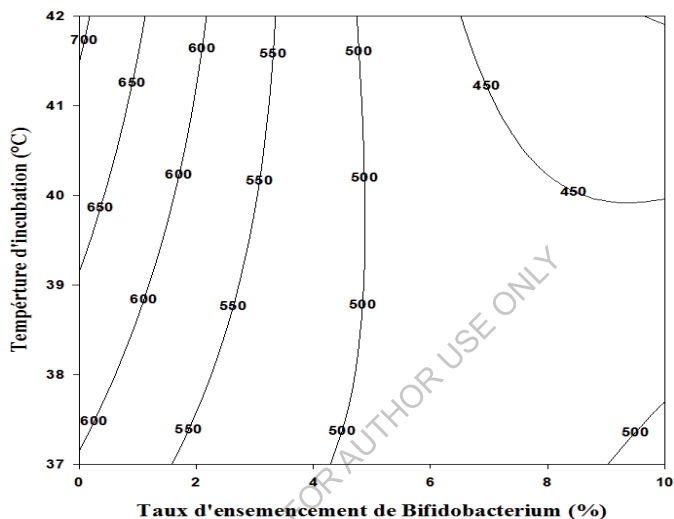


Figure 28: Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* et la température d'incubation sur la teneur en protéines.

Il ressort de cette figure que la protéolyse est plus accentuée pour des taux d'ensemencement élevé et des températures très proches de 40°C. Ceci s'expliquerait par le fait que *B.bifidum* est un germe mésophile haut dont la température de croissance optimale est de 40°C (Killer et al. 2010; Leahy et al. 2005; Lee et O'Sullivan, 2010), de ce fait, cette température paraît donc plus adaptée pour permettre la croissance rapide de ce ferment et par conséquent sa survie.

III-4-4 Modélisation du pH

Le modèle mathématique obtenu pour le suivi du p^H se présente comme suit :

$$pH = 3,7975 - 0,1092 x_1 - 0,0600 x_2 + 0,0267 x_3 - 0,2142 x_4 + 0,0479 x_1 * x_1 + 0,0592 x_2 * x_2 - 0,0283 x_3 * x_3 + 0,1004 x_4 * x_4 + 0,0550 x_1 * x_2 - 0,0225 x_1 * x_3 - 0,0400 x_1 * x_4 - 0,0375 x_2 * x_3 - 0,0275 x_2 * x_4$$

Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0.94 Ce coefficient de détermination, combinée à l'AADM de 0,008, au B_f de 1.00 et A_f de 1.008 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi du pH.

Le tableau 12 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur le pH des boissons .

Tableau 12::Analyse de variance pour le suivi du pH

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de P
Constant	3.7975	126.88	0.000
x1	-0.1092	-6.32	0.000
x2	-0.0600	-3.47	0.004
x3	0.0267	1.54	0.147
x4	-0.2142	-12.39	0.000
x1*x1	0.0479	1.96	0.072
x2*x2	0.0592	2.42	0.031
x3*x3	-0.0283	-1.16	0.267
x4*x4	0.1004	4.11	0.001
x1*x2	0.0550	1.84	0.089
x1*x3	-0.0225	-0.75	0.466
x1*x4	-0.0400	-1.34	0.204
x2*x3	-0.0375	-1.25	0.232
x2*x4	-0.0275	-0.92	0.375
x3*x4	0.0000	0.00	1.000

Les facteurs X1, X2 et X4 ont un impact significatif sur le p^H avec des probabilités de 0,00 (<0,1). L'interaction X1X2 est également significative avec une probabilité de 0,089 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) sur le pH

L'influence du taux d'ensemencement de *B.bifidum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5%, la température à 39.5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 29.

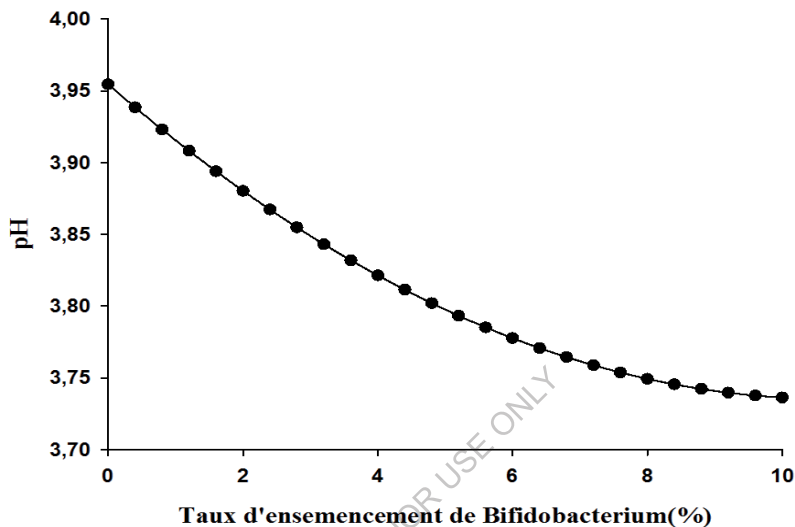


Figure 29: Effet du taux d'ensemencement de Bifidobacterium sur le pH

Il en ressort que *B.bifidum* contribue à diminuer le pH de manière significative ($P=0,000$: tableau 12). En effet, on observe une variation du pH de 3.95 à 0% de taux d'ensemencement à un p^H de 3.75 pour un taux d'ensemencement de 10%. Ce résultat va dans le même sens que ceux obtenus lors de l'influence de ce même ferment sur le Brix et la teneur en sucres où il a été démontré que celui-ci fermente les sucres pour produire des acides (lactique et acétique), d'où la chute de pH.

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur le pH

L'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 30.

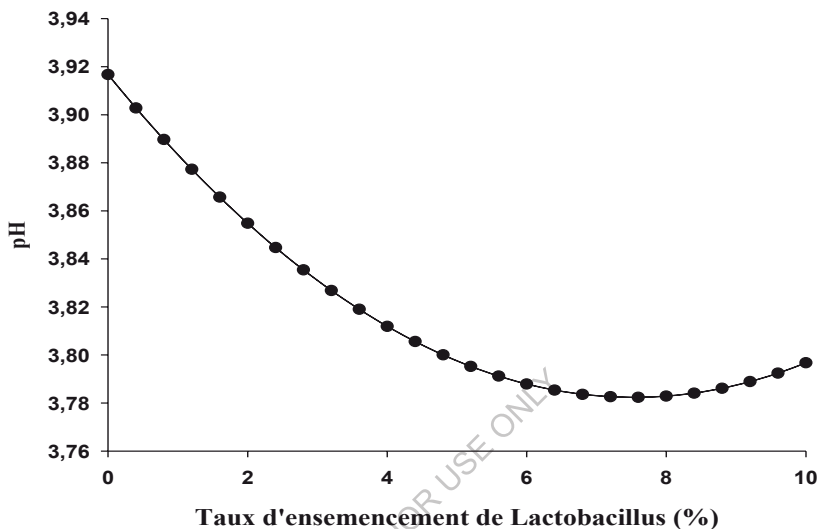


Figure 30: Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur le pH

De cette figure, on observe que le p^H décroît significativement ($p = 0,004$: tableau 12) avec l'augmentation du taux d'ensemencement de *L.fermentum*. Cependant, une très grande quantité de *L.fermentum* contribue à augmenter ce paramètre. Toutefois, l'augmentation n'est pas du tout significative devant la diminution dont les explications sont similaires à celle évoquée lors de l'étude de l'influence de *B.bifidum* sur ce même paramètre..

❖ Effet du temps d'incubation (X4) sur le pH

Après avoir fixé les taux d'ensemencement de *L.fermentum* et *B.bifidum* à 5% et la température à 39,5°C, l'influence du temps d'incubation sur le pH a été étudiée et représentée dans la figure 31.

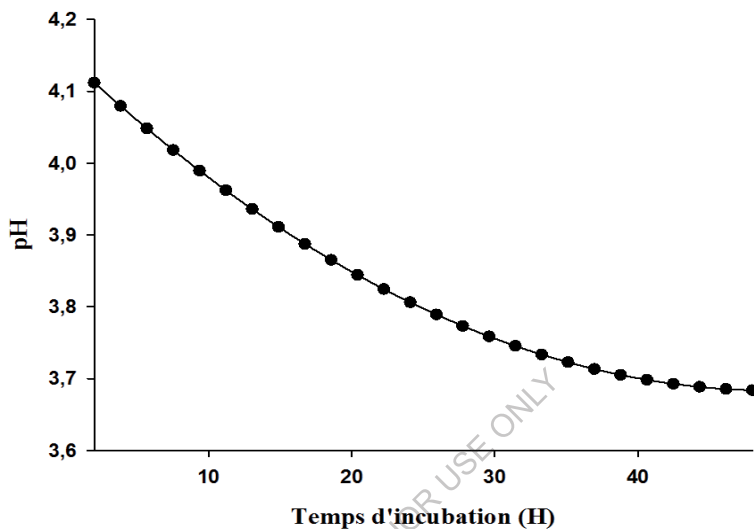


Figure 31: Effet du temps d'incubation sur le pH

On observe de cette figure, que le pH décroît significativement ($p = 0,000$: tableau 12) avec le temps. Cette courbe montre tout comme dans le cadre de l'étude de l'influence de facteur sur les sucres solubles et le Brix que la diminution du pH serait fortement corrélée au temps d'incubation. En effet, on part d'un pH de 4,1 ($t=0H$) à un p^H de 3,7 ($t=48H$). Ceci s'explique également par le fait que les deux souches fixées ici à 5% fermentent les sucres présents dans le milieu au fil du temps, produisant ainsi des acides (lactique en majorité) qui contribuent à baisser le pH.

❖ Effet de l'interaction entre les taux d'ensemencement de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sur le pH

L'effet de l'interaction entre *L.fermentum* et *B.bifidum* sur le pH a été étudié et représentée à la figure 32 après avoir fixé le temps d'incubation et le taux d'ensemencement à leurs valeurs centrales qui sont respectivement de 25H et 39,5°C.

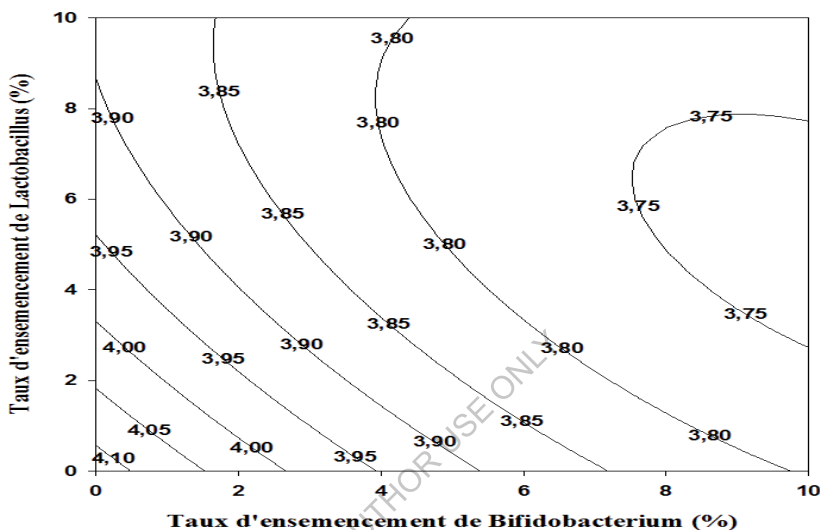


Figure 32:Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur le pH

Ce graphe nous montre que les deux ferments combinés contribuent significativement à diminuer le pH (avec une probabilité 0,089 :tableau 12). Cette diminution s'accorde avec les résultats observés précédemment sur l'influence des ferments individuels étudiée où il a été démontré que ces derniers contribuaient à diminuer le p^H . ils sont également en accord avec ceux observés sur l'influence de l'interaction entre ces ferments sur la teneur en sucres et le Brix où il a été démontré que cette interaction contribue à diminuer de façon significative ces deux paramètres; en effet les explications de cette diminution sont quasi similaires aux explications évoquées lors de l'étude de l'influence individuelles des ferments sur le pH à savoir la production d'acides lors de la fermentation des sucres présents dans le milieu.

III-4-5 Modélisation de l'acidité lactique

Le modèle mathématique obtenu se présente comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Acide lactique(g/L)} = & 5,835 + 0,4363 x_1 + 0,2625 x_2 - 0,0325 x_3 + 1,0388 x_4 - 0,0838 x_1 * x_1 \\ & - 0,2919 x_2 * x_2 + 0,2256 x_3 * x_3 + 0,3363 x_4 * x_4 - 0,262 x_1 * x_2 \\ & + 0,090 x_1 * x_3 + 0,274 x_1 * x_4 + 0,127 x_2 * x_3 + 0,067 x_2 * x_4 + 0,150 x_3 * x_4 \end{aligned}$$

Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0.96 Ce coefficient de détermination, combinée à l'AADM de 0,023, au B_f de 1.00 et A_f de 1.023 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi de l'acidité lactique..

Le tableau 13 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur l'acidité lactique.

Tableau 13: Analyse de variance pour le suivi de l'acidité lactique

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de P
Constant	5,835	48,43	0,000
x1	0,363	6,27	0,000
x2	0,2625	3,77	0002
x3	-0,0325	-0,47	0,648
x4	1,0388	14,93	0,000
x1*x1	-0,0838	-0,85	0,410
x2*x2	-0,2919	-2,97	0,011
x3*x3	0,2256	2,29	0,039
x4*x4	0,3363	3,42	0,005
x1*x2	-0,262	-2,18	0,048
x1*x3	0,090	0,75	0,468
x1*x4	0,274	2,27	0,041
x2*x3	0,127	1,06	0,309
x2*x4	0,067	0,56	0,585
x3*x4	0,150	1,25	0,235

Les facteurs X1, X2 et X4 ont un impact significatif sur cette acidité avec des probabilités de 0,00 (<0,1). Les interactions X1X2 et X1X4 sont également significatives avec des probabilités respectives de 0,048 et 0,041 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Bifidobacterium* (X1) sur l'acidité lactique

L'influence du taux d'ensemencement de *B.bifidum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *L.fermentum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 33.

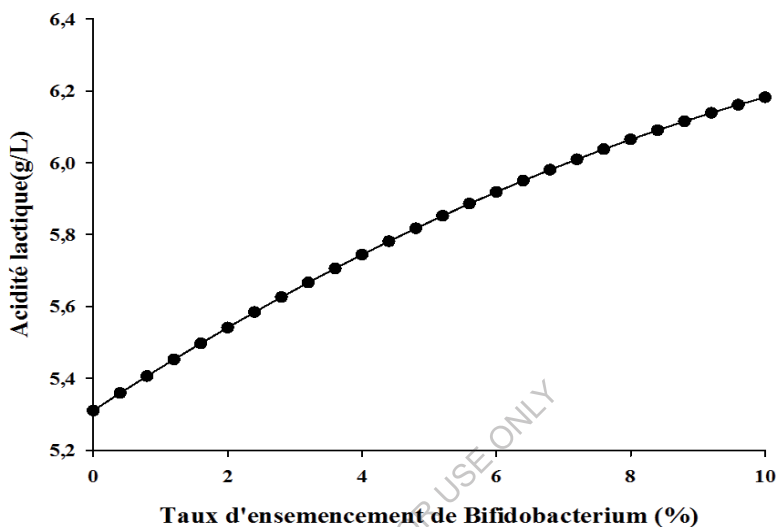


Figure 33: Effet du taux d'ensemencement de *B.bifidum* sur l'acidité

Il ressort de cette figure que ce facteur contribue à augmenter l'acidité de la boisson de façon significative ($P= 0,000$; tableau 13). En effet l'acidité va de 5,3g/L ($T=0\%$) à 6,2g/L ($T=10\%$). Cette variation est en accord les résultats observés lors de la modélisation du Brix et de la teneur en sucres réducteurs. En effet, *B.bifidum* est une bactérie hétérofermentaire dont les produits de fermentation sont en l'acide lactique en majeure partie et l'acide acétique en très faible quantité (Jalili et al. 2009; Roy et al. 2011). La métabolisation des sucres entraînant la production de ces acides est effectuée, de façon quasi spécifique aux bifidobactéries, par la voie du fructose-6-phosphate, couramment appelée la voie métabolique bifidus (Tannock. 1999). Cette voie métabolique fournit aux bifidobactéries d'avantage d'ATP que les voix fermentaires habituelles des autres bactéries et leur permet de mieux s'adapter et de se multiplier plus rapidement dans les milieux qui leurs sont favorables.

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur l'acidité lactique

L'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H est présentée par la figure 34.

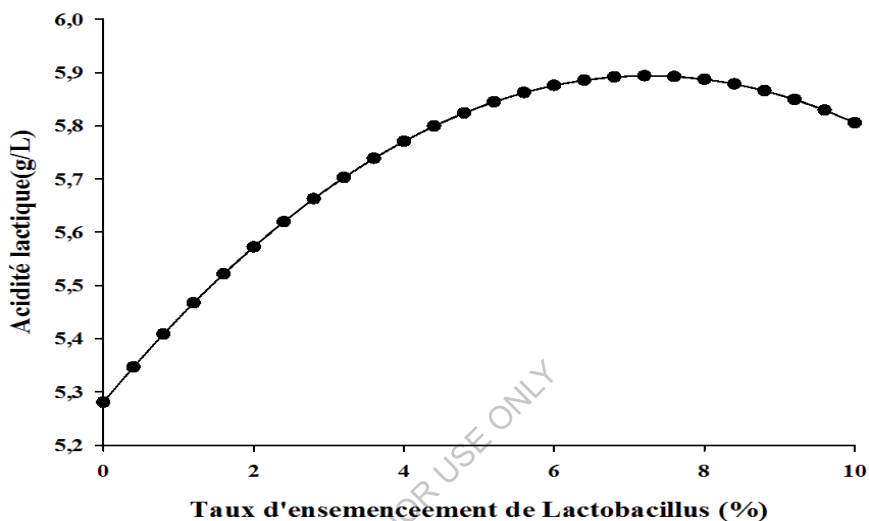


Figure 34: Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur l'acidité

On constate au regard de cette figure que la quantité d'acide lactique croît de façon significative ($P=0,003$: tableau 13) avec le taux d'ensemencement de *L.fermentum*. Cependant un taux d'ensemencement trop élevé semble contribuer à diminuer la quantité d'acide lactique. En effet, on part d'une acidité de 5,28g/L ($T=0\%$) à une acidité de 5,8 g/L ($T=7\%$). L'augmentation s'expliquerait par la production d'acide lactique produit par fermentation des sucres par *L.fermentum*. En effet, cette souche est homofermentaire et produit exclusivement de l'acide lactique (Roy et al. 2011).

❖ Effet du temps d'incubation (X4) sur l'acidité lactique

L'influence du temps d'incubation après avoir fixé les taux d'ensemencement de *L.fermentum* et *B.bifidum* à 5% et la température à 39,5°C est présentée dans la figure 35.

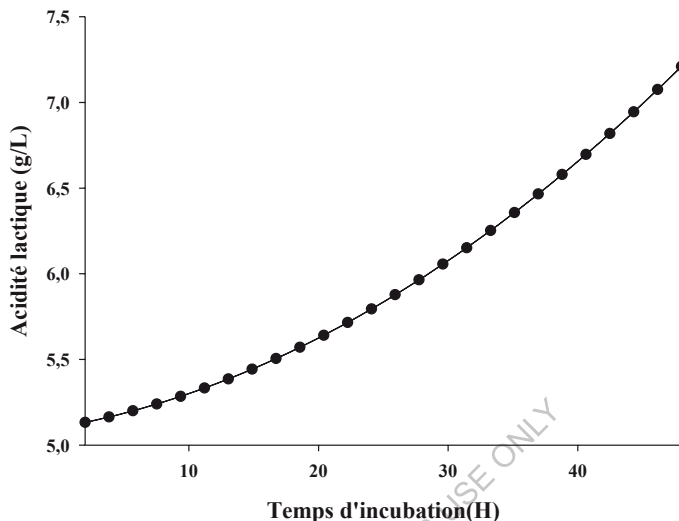


Figure 35: Effet du temps d'incubation sur l'acidité

Il ressort de cette figure que le temps contribue très fortement et de façon significative ($P=0,003$: tableau 13) à augmenter l'acidité. En effet, on part d'une acidité de 5,2 g/L (t=2H) à une acidité de 7,2g/L (t=48H). Cette augmentation s'explique ici par la fermentation des sucres par les deux ferments fixés dans ce cas à 5% et donnant ainsi lieu à la production d'acide lactique comme produit majoritaire.

❖ Effet de l'interaction entre les taux d'ensemencement de *Lactobacillus*(X2) et *Bifidobacterium* (X1) sur l'acidité lactique

L'effet de l'interaction entre *L.fermentum* et *B.bifidum* sur l'acidité a été étudié et représentée dans la figure 36 après avoir fixé le temps d'incubation et le taux d'ensemencement à leurs valeurs centrales qui sont respectivement de 25H et 39,5°C.

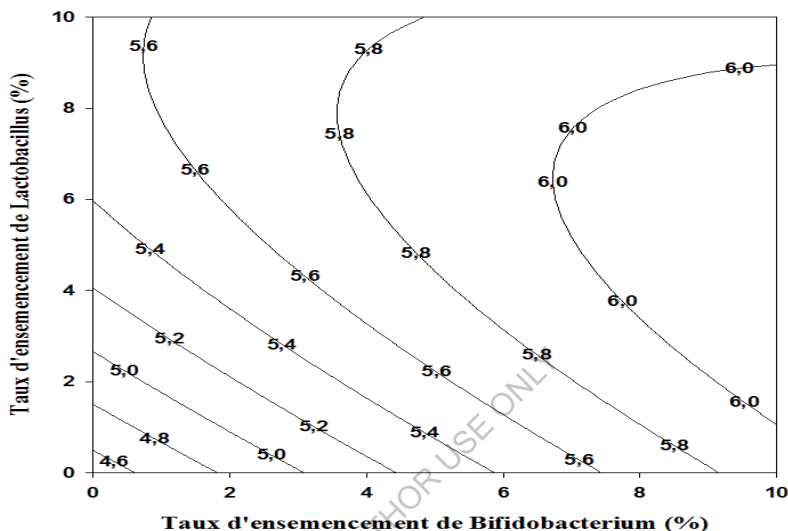


Figure 36: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur l'acidité

Cette figure nous montre que l'effet combiné de ces deux facteurs contribuent à augmenter l'acidité de façon significative (avec une probabilité 0,048 :tableau 13). Cependant le taux d'ensemencement de *B.bifidum* augmente davantage ce paramètre par rapport à celui de *L.fermentum*. Cette différence serait due au fait que, *B.bifidum* en plus d'être capable de réaliser la glycolyse comme *L.fermentum*, il a une voie de dégradation quasi spécifique aux bifidobactéries couramment appelée la voie métabolique bifidus (Tannock. 1999) qui lui fournit davantage d'ATP que les voix fermentaires habituelles des autres bactéries et lui permet de mieux s'adapter et de se multiplier plus rapidement dans les milieux et donc à produire davantage d'acide.

❖ **Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement(X1) de Bifidobacterium et le temps d'incubation (X4) sur l'acidité lactique**

Dans la plupart des procédés nécessitant une fermentation, l'interaction entre le temps d'incubation et le taux d'ensemencement joue un rôle significatif; cependant on observe ici(tableau 13) que l'interaction entre le taux d'ensemencement de *L.fermentum* et le temps n'a pas une influence significative sur le Brix($P=0,585$: tableau 10) tandis que celle du taux d'ensemencement de *B.bifidum* et le temps d'incubation l'est ($P=0,041$: tableau 13). Ce résultat corrobore avec celui observé lors de l'étude de cette même interaction sur la diminution de la teneur en sucres. En effet, on constate au vue de la figure 37 qui représente l'influence de cette interaction sur l'acidité que la combinaison de ces deux facteurs contribuent à augmenter l'acidité permettant ainsi d'atteindre la valeur la plus élevée de 7,5g/L. Ce résultat vient appuyer ceux obtenus jusqu'ici notamment ceux sur l'action individuelle du temps d'incubation et le taux d'ensemencement de *B.bifidum*.

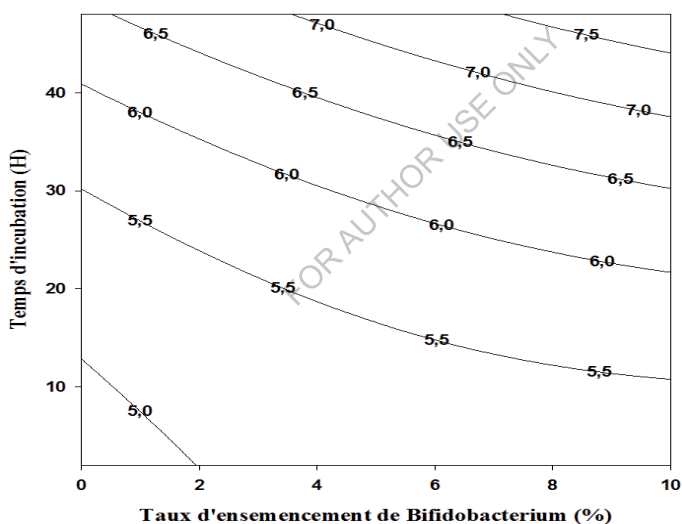


Figure 37: Effet de l'interaction entre le taux d'ensemencement de Bifidobacterium et le temps d'incubation sur l'acidité

III-5 Modélisation de l'impact des facteurs (taux d'ensemencement ; température et temps d'incubation) sur les paramètres microbiologiques de la boisson probiotique.

Le tableau 14 présente les résultats des analyses microbiologiques des boissons probiotiques. Ces résultats ont fait l'objet de modélisations mathématiques statistiques. Les caractéristiques microbiologiques telles que la charge en probiotiques (UFC/mL) et les diamètres d'inhibition de 4 souches indicatrices (*Salmonella sp.*, *E.Coli*; *Listeria monocytogenes* et *B.Cereus*) ont été suivis.

Tableau 14: Résultats moyens des analyses microbiologiques des boissons probiotiques

ESSAI	Facteurs				Réponses				
	X1	X2	X3	X4	N (UFC/mL)	<i>Salmonella</i>	<i>E.Coli</i>	<i>Listeria</i>	<i>B.Cereus</i>
1	-1	-1	0	0	0,00E+00	0	0	0	0
2	1	-1	0	0	9,80E+06	12	13	12	14
3	-1	1	0	0	3,00E+07	13	14	12	15
4	1	1	0	0	5,30E+06	14	12	13	13
5	0	0	-1	-1	1,44E+07	5	6	6	7
6	0	0	1	-1	6,70E+06	8	7	8	10
7	0	0	-1	1	1,29E+07	21	20	21	20
8	0	0	1	1	1,10E+07	20	18	20	19
9	-1	0	0	-1	3,30E+06	6	7	9	5
10	1	0	0	-1	1,25E+07	7	8	7	8
11	-1	0	0	1	2,04E+07	20	18	20	19
12	1	0	0	1	1,60E+07	20	20	19	21
13	0	-1	-1	0	1,97E+07	14	12	11	15
14	0	1	-1	0	4,48E+07	11	14	13	14
15	0	-1	1	0	9,00E+06	12	11	12	12
16	0	1	1	0	3,20E+07	18	13	15	18
17	-1	0	-1	0	1,80E+07	16	15	16	15
18	1	0	-1	0	3,74E+07	18	14	15	15
19	-1	0	1	0	1,70E+07	17	14	18	13
20	1	0	1	0	1,88E+07	15	12	13	14
21	0	-1	0	-1	6,90E+06	7	7	8	9
22	0	1	0	-1	1,35E+07	7	8	8	9
23	0	-1	0	1	1,18E+07	18	21	20	22
24	0	1	0	1	1,35E+07	20	23	15	20
25	0	0	0	0	1,67E+07	15	14	15	15
26	0	0	0	0	1,60E+07	16	13	16	14
27	0	0	0	0	1,45E+07	15	15	16	15
28	0	0	0	0	1,50E+07	14	13	16	13

X1=Taux d'ensemencement de Bifidobacterium ;X2=Taux d'ensemencement de Lactobacillus ; X3= Température d'incubation; X4= temps d'incubation

III-5-1 Modélisation de la charge en probiotiques

Pour être efficaces, les probiotiques doivent atteindre l'intestin en quantité suffisante (Kailasapathy et Chin, 2000). Il apparaît clairement que pour concurrencer le microbiote intestinal - estimé à 10^{14} bactéries - et influencer positivement la santé, une dose minimale importante de probiotiques (10^6) est requise (Thomsen, 2006). Ainsi, pour maîtriser ce paramètre, le modèle mathématique obtenu se présente comme suit :

$$N \text{ (UFC/mL)} = 15550000 + 925000 x_1 + 6825000 x_2 - 4391667 x_3 + 2358333 x_4 - 241667 x_1 * x_1 + 733333 x_2 * x_2 + 6408333 x_3 * x_3 - 5941667 x_4 * x_4 - 8625000 x_1 * x_2 - 4400000 x_1 * x_3 - 3400000 x_1 * x_4 - 525000 x_2 * x_3 - 1225000 x_2 * x_4 + 1450000 x_3 * x_4$$

Ce modèle a un coefficient de détermination (R^2) de 0,72, Ce coefficient de détermination, combinée à l'AADM de 0,652 et au B_f de 1,106 permettent de dire que le modèle est valide pour le suivi de la quantité de probiotiques.

Le tableau 15 présente les coefficients des facteurs et leur impact sur la quantité de probiotiques.

Tableau 15:Analyse de variance pour le suivi de la charge en probiotiques

Termes	Coeff	Valeur de T	Valeur de P
Constant	15550000	4,13	0,001
x1	925000	0,43	0,678
x2	6825000	3,14	0,008
x3	-4391667	-2,02	0,265
x4	2358333	1,08	0,298
x1*x1	-241667	-0,08	0,939
x2*x2	733333	0,24	0,815
x3*x3	6408333	2,08	0,058
x4*x4	-5941667	-1,93	0,076
x1*x2	-8625000	-2,29	0,039
x1*x3	-4400000	-1,17	0,264
x1*x4	-3400000	-0,90	0,383
x2*x3	-525000	-0,14	0,891
x2*x4	-1225000	-0,33	0,750
x3*x4	1450000	0,38	0,707

Les facteurs X2, X3 ainsi que l'interaction entre X1 et X2 ont un impact significatif sur la quantité de probiotique avec des probabilités respectives de 0,008 ; 0,065 et 0,039 (<0,1).

❖ Effet du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* (X2) sur la quantité de probiotiques

La figure 38 présente l'influence du taux d'ensemencement de *L.fermentum* sur la quantité de probiotiques après avoir fixé le taux d'ensemencement de *B.bifidum* à 5%, la température à 39,5°C et le temps d'incubation à 25H.

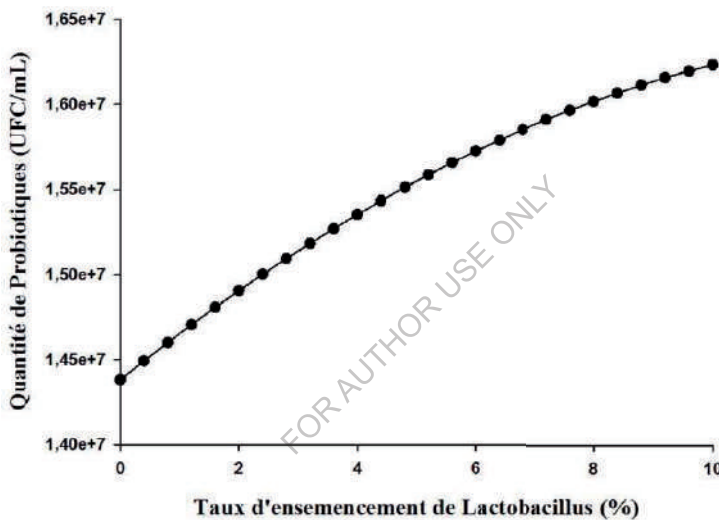


Figure 38: Influence du taux d'ensemencement de *Lactobacillus* sur la quantité de probiotiques

Il en ressort que le taux d'ensemencement de *L.fermentum* contribue de façon significative à augmenter ce paramètre ($P=0,008$: tableau 15). Ce résultat est tout à fait en accord avec ceux obtenus sur l'étude de l'influence de ce ferment sur la teneur en protéines où nous avons démontré que celui-ci utilisait une grande quantité de protéines afin d'avoir assez d'acides aminés pour assurer sa multiplication.

❖ **Influence de l'interaction entre le taux d'ensemencement de *L.fermentum*(X2) et le taux d'ensemencement de *B.bifidum* (X1) sur la quantité de probiotiques**

L'effet de l'interaction entre *L.fermentum* et *B.bifidum* sur La quantité de probiotiques a été étudié et représenté à la figure 39 ceci après avoir fixé le temps d'incubation et le taux d'ensemencement à respectivement à 25H et 39,5°C.

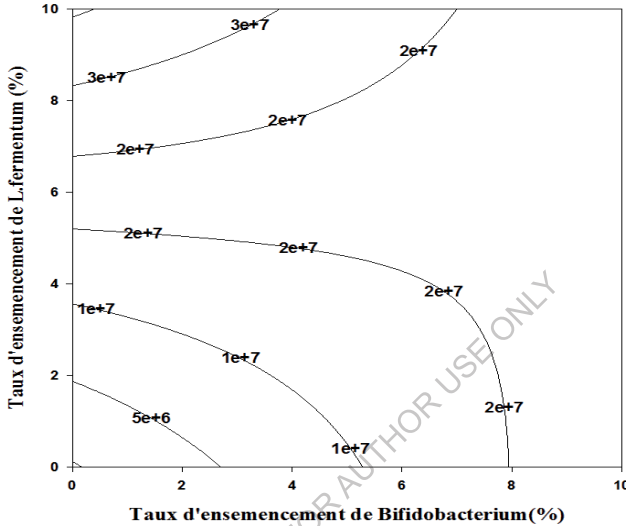


Figure 39: Influence de l'interaction entre les taux d'ensemencement de Bifidobacterium et de Lactobacillus sur la quantité de probiotiques

Ce graphe nous montre que les deux ferments mis ensemble contribuent significativement à augmenter la quantité de probiotiques(avec une probabilité 0,039 :tableau 15). Ce résultat rejoint celui observé dans le paragraphe précédent sur l'étude de l'impact de *L. fermentum* sur la quantité de probiotiques et aurait par conséquent la même explication.

Cependant, on remarque que le temps d'incubation associé à *B.bifidum* contribue à diminuer la quantité de probiotiques, ceci serait probablement dû à la production des acides organiques (acide lactique) et également à la production des composés antimicrobiens comprenant le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'acétaldéhyde, les isomères des acides aminés et les bactériocines (Cintas et al., 2001).

III-5-2 Modélisation des diamètres d'inhibition des souches indicatrices

Les modèles obtenus pour le suivi des diamètres d'inhibition des souches indicatrices sont :

$$D \text{ Salmonella(mm)} = 15,00 + 1,167 x_1 + 1,667 x_2 + 0,417 x_3 + 6,583 x_4 - 1,04 x_1 * x_1 - 2,54 x_2 * x_2 + 1,08 x_3 * x_3 - 0,92 x_4 * x_4 - 2,75 x_1 * x_2 - 1,00 x_1 * x_3 - 0,25 x_1 * x_4 + 2,25 x_2 * x_3 + 0,50 x_2 * x_4 - 1,00 x_3 * x_4$$

$$D \text{ E. Coli(mm)} = 13,75 + 0,917 x_1 + 1,667 x_2 - 0,500 x_3 + 6,417 x_4 - 1,29 x_1 * x_1 - 1,17 x_2 * x_2 - 0,17 x_3 * x_3 + 0,71 x_4 * x_4 - 3,75 x_1 * x_2 - 0,25 x_1 * x_3 + 0,25 x_1 * x_4 + 0,00 x_2 * x_3 + 0,25 x_2 * x_4 - 0,75 x_3 * x_4$$

$$D \text{ Listeria(mm)} = 15,75 + 0,333 x_1 + 1,083 x_2 + 0,333 x_3 + 5,750 x_4 - 1,58 x_1 * x_1 - 3,46 x_2 * x_2 + 0,17 x_3 * x_3 - 0,71 x_4 * x_4 - 2,75 x_1 * x_2 - 1,00 x_1 * x_3 + 0,25 x_1 * x_4 + 0,25 x_2 * x_3 - 1,25 x_2 * x_4 - 0,75 x_3 * x_4$$

$$D \text{ B.cereus(mm)} = 14,25 + 1,500 x_1 + 1,417 x_2 + 0,000 x_3 + 6,083 x_4 - 1,75 x_1 * x_1 - 0,63 x_2 * x_2 + 0,75 x_3 * x_3 + 0,37 x_4 * x_4 - 4,00 x_1 * x_2 + 0,25 x_1 * x_3 - 0,25 x_1 * x_4 + 1,75 x_2 * x_3 - 0,50 x_2 * x_4 - 1,00 x_3 * x_4$$

Ces modèles ont été validés sur la base de leurs coefficients de détermination associés à leur AADM, leur Af et leur Bf qui sont tous dans les normes. Ainsi, pour chacun des diamètres d'inhibition, les paramètres de validation sont consignés dans le tableau 17 :

Tableau 16: Récapitulatif des paramètres de validation des modèles du suivi des diamètres d'inhibition

	R ²	AADM	Af	Bf
D <i>Salmonella sp</i> (mm)	0,87	0,116	0,977	1,124
D <i>E. Coli</i> (mm)	0,88	0,094	0,983	1,101
D <i>L.monocytogenes</i> (mm)	0,80	0,114	0,975	1,130
D <i>B.cereus</i> (mm)	0,88	0,083	0,983	1,089

Le tableau 16 présente l'analyse de la variance pour le suivi des diamètres des 4 souches indicatrices.

Tableau 17: Analyse de la variance pour le suivi des diamètres d'inhibition des souches indicatrices

Termes	<i>E.coli</i>		<i>L.moncytogenes</i>		<i>B.cereus</i>		<i>Salomonella sp</i>	
	Coeff	Valeur de P	Coeff	Valeur de P	Coef	Valeur de P	Coeff	Valeur de P
Constant	13,75	0,000	15,75	0,000	14,25	0,000	15,00	0,000
x1	0,917	0,233	0,333	0,722	1,500	0,058	1,167	0,173
x2	1,667	0,041	1,083	0,259	1,417	0,072	1,667	0,060
x3	-0,500	0,507	0,333	0,722	0,000	1,000	0,417	0,615
x4	6,417	0,000	5,750	0,000	6,083	0,000	6,583	0,000
x1*x1	-1,29	0,235	-1,58	0,244	-1,75	0,110	-1,04	0,379
x2*x2	-1,17	0,281	-3,46	0,019	-0,63	0,551	-2,54	0,045
x3*x3	-0,17	0,875	0,17	0,900	0,75	0,476	1,08	0,361
x4*x4	0,71	0,506	-0,71	0,594	0,37	0,719	-0,92	0,438
x1*x2	-3,75	0,011	-2,75	0,107	-4,00	0,007	-2,75	0,072
x1*x3	-0,25	0,847	-1,00	0,540	0,25	0,845	-1,00	0,488
x1*x4	0,25	0,847	0,25	0,877	-0,25	0,845	-0,25	0,861
x2*x3	0,00	1,000	0,25	0,877	1,75	0,185	2,25	0,133
x2*x4	0,25	0,847	-1,25	0,446	-0,50	0,696	0,50	0,727
x3*x4	-0,75	0,565	-0,75	0,645	-1,00	0,438	-1,00	0,488

Il ressort de ce tableau que *B.bifidum* n'a pas un fort pouvoir antagoniste sur *E.coli*, *L.moncytogenes* et *Salomonella sp* tandis qu'il l'a sur *B.cereus*($p=0.058$:tableau 16). Cependant, *L.fermentum* a un effet antagoniste significatif sur *Salomonella sp*, *E.coli* et *B.cereus* avec des probabilités respectives de 0,060, 0,040 et 0,072. Par ailleurs le temps d'incubation a une influence significative sur les 4 paramètres en contribuant notamment à les augmenter de façon significative avec des probabilités de 0,000.

En effet, les bactéries lactiques exercent une forte activité antagonistique contre plusieurs microorganismes, y compris ceux de la détérioration des aliments et des microbes pathogènes. En outre, l'effet antimicrobien de quelques souches permet de prolonger la durée

de conservation des aliments (Haller, 2001; O'Sullivan et al., 2002). Cet effet est principalement dû à la production des acides organiques (acide lactique) et également à la production des composés antimicrobiens comprenant le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'acétaldéhyde, les isomères des acides aminés et les bactériocines (Cintas et al., 2001).

Callaway et al. (2008) et Garcia et al. (2010) ont rapporté que les bactéries bénéfiques, principalement les bactéries lactiques et les bifidobactéries peuvent être une stratégie utile et efficace pour empêcher ou réduire l'incidence des microbes pathogènes, de ce fait améliorer l'innocuité des aliments et protéger la santé du consommateur. En effet, La production d'acide lactique diminue le pH en créant un milieu défavorable au développement des microorganismes pathogènes (Aslim et al., 2004). Cet acide se trouve à l'équilibre entre ses formes dissociées et non dissociées, et l'ampleur de la dissociation dépend du pH. Au bas pH, la grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée qui est toxique pour beaucoup de bactéries, mycètes et levures. A pH 5,0 l'acide lactique est un inhibiteur des bactéries sporulées mais il est inefficace contre des levures et les moisissures (Woolford, 1975).

III-6 Optimisation des paramètres physicochimiques et microbiologiques de la boisson probiotique

Le but cette optimisation est de trouver un compromis satisfaisant entre chacune des caractéristiques de la boisson probiotique en établissant un cahier de charge dont les conditions sont les suivantes:

- Brix, teneur en sucres réducteurs, teneur en protéines : maximum
- Diamètres d'inhibition des souches indicatrices : 14 mm pour Salmonella et 12 mm pour les 3 autres souches testées.
- Acidité titrable : 9 g d'acide lactique/L
- pH : 4 ;
- Quantité de probiotiques : 1,00E+10 UFC/mL

L'optimisation a conduit aux conditions expérimentales optimales suivantes :

- Taux d'ensemencement de *B.bifidum*: 10% ;
- Taux d'ensemencement de *L.fermentum* :2,82% ;

- température d'incubation : 37 °C ;
- Temps d'incubation : 14H2min.

Le tableau 18 présente les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques théoriques et expérimentales optimales obtenues.

Tableau 18 : Valeurs des caractéristiques optimales de la boisson probiotique

Réponse	Valeurs théoriques	Valeurs expérimentales
Acidité titrable (g d'acide lactique/L)	6,87	8
pH	3,84	3,87
Protéines (mg/L)	586,6	574,2
Sucres (mg/mL)	19,48	21,06
Brix	5,47	5,2
Quantité de probiotiques (UFC/mL)	3,13E+7	1,13E+8
D <i>Salmonella sp</i> (mm)	14,01	15
D <i>E.coli</i> (mm)	11,30	13
D <i>B.cereus</i> (mm)	12,87	11
D <i>L.monocytogenes</i> (mm)	14,73	14

Nous pouvons observer que les valeurs expérimentales sont presque similaires à celles théoriques, ce qui confirme l'adéquation des modèles utilisés dans cette étude.

III-7 Résultats de l'analyse sensorielle

Vingt panélistes ont été sélectionnés pour mener à bien cette évaluation sensorielle, chaque attribut a été mesuré selon une échelle d'intensité de 1 à 9, où 1 est la pondération d'un caractère non détecté et 9 correspond à un caractère détecté extrêmement fort. Les résultats de cette analyse sont groupés dans le tableau 19.

Tableau 19: Résultats de l'analyse sensorielle.

Attribut	Moyennes des notes attribuées	
	Boisson optimale	Sève fraîche
Flaveur	7.05±1.19	5.9±1.61
Acidité	3.25±1.06	2.2±1.15
Goût	6.35±0.74	3.95±1.05
Acceptabilité générale	6.75±0.85	4.3±1.21

La figure 40 représente une meilleure illustration de ces résultats. Il ressort de cette figure que notre boisson probiotique est meilleure que la sève fraîche en terme de flaveur probablement du fait de la production de certains composés aromatiques par *L.fermentum* et *B.bifidum*. Par ailleurs, selon les panélistes, elle serait plus acide que la sève fraîche ; ceci s'expliquerait par la production de l'acide lactique par les deux ferments tel qu'il a été démontré dans le cadre de l'étude de leur influence sur l'acidité et le pH. En somme, il apparait clairement que la boisson probiotique est réellement acceptable et nettement appréciée sur le plan organoleptique par comparaison à la sève fraîche.

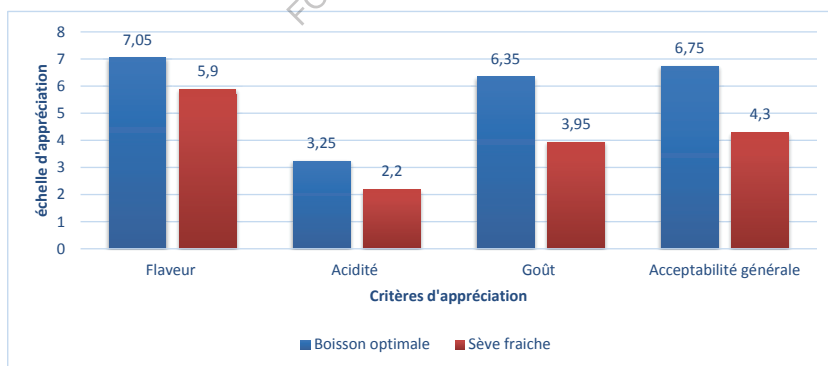


Figure 40: Résultats de l'analyse sensorielle

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal était de déterminer les conditions optimales de production d'une boisson probiotique à base de sève de raphia fermentée par *L.fermentum* et *B.bifidum*. il a été question dans un premier temps de caractériser la sève sur le plan physicochimique puis d'étudier les aptitudes des ferments et enfin de faire une modélisation mathématiques des paramètres physicochimiques et microbiologiques de la boisson à travers le modèle de Box-Behnken afin d'en ressortir les conditions opératoires optimales. La caractérisation physicochimique de la sève a montré que celle-ci contient $3,801\% \pm 0,037$ de matière sèche, $7,044 \pm 0,172$ de cendres par 100g de matière sèche, $10,789 \pm 1,388$ g de sucres réducteurs par Litre ,une acidité titrable de 4.44 équivalent gramme d'acide lactique par L, un p^H de 4.12, $2,91 \pm 0,94$ g de composés phénoliques totaux par Litre, une masse volumique de 1.158g/L et un Brix de 4.2 . Par ailleurs, les deux ferments se sont avérés viables dans cette matrice et l'optimisation des paramètres physicochimiques a conduit aux conditions opératoires suivantes : un taux d'ensemencement de *B.bifidum* de 10% , un taux d'ensemencement de *L.fermentum* de 2.82% , une température d'incubation de 37°C et un temps d'incubation de 14H2min. Au-delà de cette optimisation, une analyse sensorielle réalisée sur le produit optimisé a montré que celui-ci était acceptable tant sur le plan du goût et de l'acidité que sur la flaveur et l'acceptabilité générale.

Toutefois il serait impératif pour compléter ce travail :

- D'étudier l'effet de la conservation sur le produit optimisé afin d'en déduire la date de péremption ;
- De reprendre l'étude de la quantité de probiotique en utilisant la technique de PMA-PCR ;
- De réaliser des estimations financières afin d'envisager une éventuelle commercialisation de notre boisson probiotique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AFNOR (1981).***Recueil de normes françaises. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés.* AFNOR, Paris (France), 2^{ème} édition.
2. **AFNOR (Association Française de Normalisation) (1982).** *Recueil des normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes. Jus de fruits.* 1^{ère} éd., Paris la défense (France).
3. **Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., 2005.** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3 : 59-63.
4. **Alemka, A., Clyne, M., Shanahan, F., Tompkins, T., Corcionivoschi, N., and Bourke, B. (2010).** Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties. *Infection and Immunity* 78, 2812-2822.
5. **Al-Otaibi M.M., 2009.** Evaluation of some probiotic fermented milk from el ahsa markets, Saudi Arabia. *American Journal of Food Technology*, 4, 1-8.
6. **Ammor M.S. et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146
7. **Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Soli's, G., Salminen, S., de los Reyes- Gavilán, C.G., and Gueimonde, M. (2010).** Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology.*
8. **Aslim B., Yuksekdog Z.N., Sarikaya E. et Beyatli Y., 2004.** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT- Food Science and Technology*, 1, 1-4.
9. **Azizpour, K., Bahrambeygi, S., and Mahmoodopour, S. (2009).** History and basic of probiotics. *Research Journal of Biological Sciences* 4, 409-426.
10. **Bergeret B. et Masseyet R. (1957).** Tables de composition de quelques aliments tropicaux.5, 64-65.
11. **Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S. et Gueguen M., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278-285.

12. **Bernardeau, M., Guguen, M., and Vernoux, J.P. (2006).** Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 487-513.
13. **Biagi, E., Candela, M., Fairweather-Tait, S., Franceschi, C, and Brigidi, P. (2011).** Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age*, 1-21.
14. **Box G.E.P. et Behnken D.W., 1960.** Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–75.
15. **Box G.E.P. et Behnken D.W., 1960.** Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–75.
16. **Boyle, R.J., Robins-Browne, R.M., and Tang, M.L. (2006).** Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition* 83, 1256-1264.
17. **Callaway T. R., Edrington T. S., Anderson R. C., Harvey R. B., Genovese K. J. et Kennedy C. N., 2008.** Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Animal Health Research Reviews*, 9, 217-225.
18. **Chamba J.F ., 1990.** Pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles. *Lait*, 492, 47-50.
19. **Champagne, CP., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., and Charalampopoulos, D. (2011).** Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149, 185-193.
20. **Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F. et Hernández P.E., (2001).** Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, 7,281–305.
21. **Clavero, M.R.S., Brackett, R.E., Beuchat, L.R., and Doyle, M.P. (2000).** Influence of water activity and storage conditions on survival and growth of proteolytic *Clostridium botulinum* in peanut spread. *Food Microbiology* 17, 53-61.
22. **Collado, M.C, Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007).** Development of new probiotics by strain combinations: is It possible to improve the adhesion to intestinal mucus? *Journal of Dairy Science* 90, 2710-2716.
23. **De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2004).** Environmental stress responses in *Lactobacillus* : a review. *Proteomics* 4, 106-122.

24. **Denohue D.C., 2004.** Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 531-546.
25. **Dianawati, D., and Shah, N.P. (2011).** Enzyme stability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bbl2 after freeze drying and during storage in low water activity at room temperature. *Journal of Food Science* 76, M463-M471.
26. **Dykstra, N.S., Hyde, L., Adawi, D., Kulik, D., Ahrne, S., Molin, G., Jeppsson, B., Mackenzie, A., and Mack, D.R. (2011).** Pulse probiotic administration induces repeated small intestinal Muc3 expression in rats. *Pediatric research* 69, 206-211.
27. **Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., and Akbarian-Moghari, A. (2011).** Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science* 94, 3288-3294.
28. **FAO et OMS, 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food, report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in Food
29. **FAO/OMS (2001).** Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Rapport conjoint des experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation Mondiale de la Santé. Cordoba, Argentine.
30. **Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M., and Caderni, G. (2002).** Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23, 1953-1960.
31. **Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S. et dos Santos W.N.L., 2007.** Box- Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytical and Chemical Acta*, 597, 179-186.
32. **Fischer E. & Stein E.A. (1961).** DNS colorimetric determination of available carbohydrates in foods. *Biochemical Preparation* 8: 30 – 37.

33. **Garcia P., Rodriguez L., Rodriguez A. et Martinez B., 2010.** Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, **21**, 373-382.
34. **Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 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.* 21 : 97-102.
35. **Gomes, A.M.P., and Malcata, F.X. (1999).** *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10, 139-157.
36. **Goupy J. et Creighton L., 2006.** Introduction aux plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France.
37. **Goupy J., 2005.** Pratiquer les plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France.
38. **GOUPY J., 2006.** Les plans d'expériences. *Revue Modulad*, **34**, 74-116.
39. **Guo Y., Pan D., Zeng X. et Tanokura M., 2009.** Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Food Chem.* 112 : 533-538.
40. **Heller, K.J. (2001).** Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 374S-379S.
41. **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365S-373S.
42. **Hujanen M., Linko S., Linko Y.Y. et Leisola M., 2001.** Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30, 99-109.
43. **Jalili, H., Razavi, S.H., Safari, M., and Malcata, F.X. (2009).** Enhancement of growth rate and P-galactosidase activity, and variation in organic acid profile of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 469-476.
44. **Juntunen. M., Kirjavainen. P.V., Ouwehand. A.C, Salminen, S.J., and Isolauri, E. (2001).** Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 8. 293-296.
45. **Kafo C., Dougtio Deudja., et Elat. (2013).** Ouest Cameroun:Valorisation des produits locaux. L'exemple du vin de raphia, *économie rurale* 336, 61-79..

46. **Kailasapathy K., 2002.** Microencapsulation of probiotic bacteria : technology and potential applications. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 3 : 39-48.
47. **Kailasapathy, K. Harmstorf, I., and Phillips. M. (2008).** Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1317-1322.
48. **Kanmani, P., Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011).** Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16, 1106-1114.
49. **Kheadr, E.E. (2006).** Impact of acid and oxgall on antibiotic susceptibility of probiotic lactobacilli *African Journal of Agricultural Research* 7, 172-181.
50. **Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., and Kofronová, O. (2010).** *Bombiscardovia coagulans*, a new member of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 359-366.
51. **Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., and Kofronová, O. (2010).** *Bombiscardovia coagulans*, a new member of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 359-366.
52. **Kleerebezem, M., and Vaughan, E.E. (2009).** Probiotic and gut Lactobacilli and Bifidobacteria : molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology* 63, 269-290.
53. **Klijn, A., Mercenier, A., and Arigoni, F. (2005).** Lessons from the genomes of Bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 491-509.
54. **Kolida, S., Saulnier, D., and Gibson, G. (2006).** Gastrointestinal microflora : probiotics. *Advances in Applied Microbiology* 59, 187-219.
55. **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250.
56. **Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canada.* 23-47.

57. **Leahy, S.C, Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., and Sinderen, D. (2005).** Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1303-1315.
58. **Lee, J.-H, and O'Sullivan. D.J. (2010).** Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 378-416
59. **Levy S.B. et Marshall B., 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Journal of Natural Medicines*, 10, 122-129.
60. **Lewis, S.J., and Burmeister, S. (2005).** A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *Eur J Clin Nutr* 59, 776-780
61. **Lowry O. H, Rosebroughi N. J, Farr A. L, and Randall R. J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, Vol. 193, Issue 1, pp. 265–275.
62. **Lupien-meilleur J., 2012.** Détermination des conditions de viabilité et de fonctionnalité de probiotiques ajoutés à une boisson santé à base de sève d'érable. 125-134.
63. **Marigo G. (1973).** Méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis* 106 – 110.
64. **Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., and Swings, J. (2004).** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1137-1143
65. **Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., and Saarela, M. (2002).** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 72, 173-182.
66. **Matto, J., Fonden, R., Tolvanen, T., Vonwright, A., Vilpponensalmela, T., Satokari, R., and Saarela, M. (2006).** Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *International Dairy Journal* 7r5, 1174-1180.
67. **Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., 2008.** Characterization of probiotic properties of *Lctobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* 88 : 695-705.
68. **Mitsuoka, T. (1992).** Intestinal flora and aging. *Nutrition Reviews* 50, 438-446.

69. **Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G., 2008.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Corrieu G. et Luquet F.M. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
70. **Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., 2004.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560.
71. **O'Sullivan L., Ross R.P. et Hill C., 2002.** Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**, 593-604.
72. **Oksaharju, A., Kankainen, M., Kekkonen, R.A., Lindstedt, K.A., Kovanen, P.T., Korpela, R., and Miettinen, M. (2011).** Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* downregulates FCER1 and HRH4 expression in human mast cells. *World Journal of Gastroenterology* 7 7, 750-759.
73. **O'Toole, P.W., and Claesson, M.J. (2010).** Gut microbiota : Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* 20, 281-291.
74. **Ouwehand, A.C, Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., ölkkö, ST., and Salminen, S.J. (2000a).** The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bbl2 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* 30, 10-13.
75. **Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49(3-4) : 46-54.
76. **Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S., Hong S.I. et Kim S.W., 2002.** Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 761-766.
77. **Patricia RM., Tuinier R., Kaning M. et Zoon P., 2002.** Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milk. *International Dairy Journal*, 12, 689- 695.
78. **Patterson C.A., 2008.** Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. AAFC. 1-4.
79. **Percival M., 1997.** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* 6(1): 95-100.

80. perspectives and challenges. *Trend in Biotechnology*, 21, 269–274.
81. **Picard, C, Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Néant, F., and Matuchansky, C. (2005).** Review article : Bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 22, 495-512.
82. **Podlesny, M., Jarocki, P., Komon, E., Glibowska, A., and Targonski, Z. (2011).** LC- MS/MS analysis of surface layer proteins as a useful method for the identification of lactobacilli from the *Lactobacillus acidophilus* group. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 421-429.
83. **Pokusaeva, K., Fitzgerald, G., and van Sinderen, D. (2011).** Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition* 6, 285-306.
84. **Prasad, J., Gill, H, Smart, J., and Gopal, P.K. (1998).** Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
85. **Reid, G., and Hammond, J.-A. (2005).** Probiotics. Some evidence of their effectiveness. *Canadian Family Physician* 57, 1487-1493.
86. **Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C, Gloor, G.B., Knight, R., and Busscher, H.J. (2011).** Microbiota restoration : natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews* 9, 27-38.
87. **Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas- Madiedo P., 2011.** Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* 162 : 514-519
88. **Robin J.M. et Rouchy A., 2001.** Les probiotiques. *CEDN. Nutrithérapie. Info.1-4.*
89. **Rokka S. et Rantamaki P., 2010.** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* 213 : 1-12
90. **Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N.E., 2009.** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European Journal of Science Research*, 34, 218-227.
91. **Roy, D., Thierry, A., and Jan. G. (2011).** Dairy Propionibacteria and Bifidobacteria. In *The Role of food. Agriculture. Forestry and Fisheries in Human Nutrition.*[Ed-

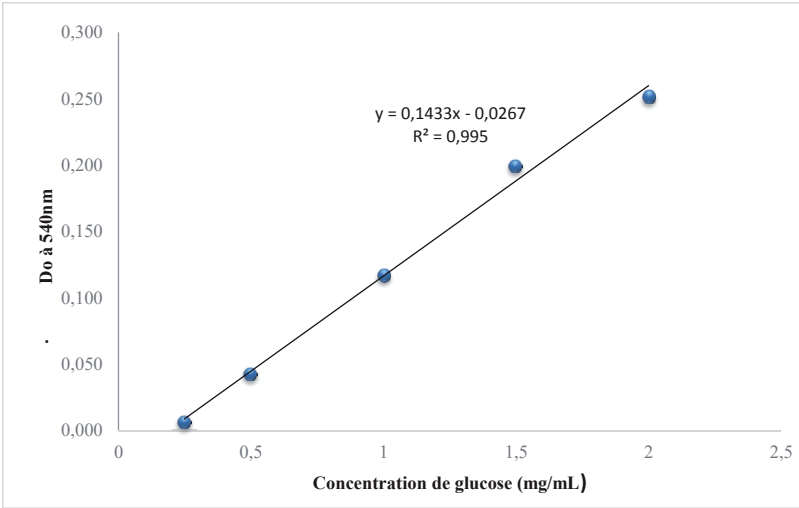
-],in Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers, Oxford,UK, [<http://www.eolss.net>] [Retrieved November 9, 2011].
92. **Roy, D. (2005).** Technological aspects related to the use of Bifidobacteria in dairy products. *Lait* 85, 39-56.
 93. **Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84 : 197-215.
 94. **Saarela. M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Sigvart-Mattila. P., and Mättö, J. (2006).** Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16, 1477-1482.
 95. **Sadhukhan A.K., Ramana Murthy M.V., Ajaya Kumar R., Mohan EV.S., Vandana G., Bhar C. et Venkateswara Rao K., 1999.** Optimization of mycophenolic acid production in solid-state fermentation using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22, 33-38.
 96. **Sado G.M. et Sado C., 2000.** Les plans d'expériences, AFNOR.
 97. **Salminen S., Gorbach S., Lee Y.K. et Benno Y., 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.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 515-530.)
 98. **Sanders, M.E., and Huis in't Veld, J. (1999).** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293-315.
 99. **Santivarangkna, C, Kulozik, U., and Foerst, P. (2008).** Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* 705, 1-13.
 100. **Schrezenmeir. J., and de Vrese, M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361S-364S.
 101. **Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17 : 1262-1277.
 102. **Sleator, R.D., and Hill, C. (2008).** Engineered pharmabiotics with improved therapeutic potential. *Human Vaccines* 4, 271-274.

103. **Starling, S. (2010).** Global probiotics market approaching \$30bn by 2015 : report. Nutra ingredients <http://www.nutraingredients.com/Consumer-Trends/Global-probiotics-market-approaching-30bn-by-2015-Report>.
104. **Stoyancheva, G.D., Danova. S.T.. and Boudakov. I.Y. (2006).** Molecular identification of vaginal lactobacilli isolated from Bulgarian women. *Antonie van Leeuwenhoek* 90, 201-210.
105. **Sullivan, Â., and Nord, CE. (2005).** Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine* 257, 78-92.
106. **Sunitha I., Subba Rao M.V. et Ayyanna C.,1998.** Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the co-immobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. *Bioprocessing and Engineering*, 18, 353-359.
107. **Tadesse G., Ephraim E.et Ashenafi M., 2004.** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Int. J. Food Safety*. 5 : 13-20.
108. **Tamime, A.Y., Saarela, M., Sondergaard, A.K., Mistry, V.V., and Shah, N.P. (2007).** Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In *Probiotic Dairy Products*, A. Tamime, ed. (Oxford, UK, Blackwell Science Ltd), pp. 39-72.
109. **Tannock, G.W. (1997).** Probiotic properties of lactic-acid bacteria : plenty of scope for fundamental R&D. *Trends in Biotechnology* 75, 270-274.
110. **Tannock, G.W. (1999).** Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current issue in molecular biology* 7, 53-64.
111. **Thomsen, M. (2006).** Probiotics - enhancing health with beneficial bacteria. *Alternative and Complementary Therapies* 72, 14-21.
112. **Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996.** Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isolated from Growol. Indonesian. *Food Nutr. Prog.* 3(2) : 29-34.
113. **Tuomola, E.M., and Salminen, S.J. (1998).** Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41, 45-51.

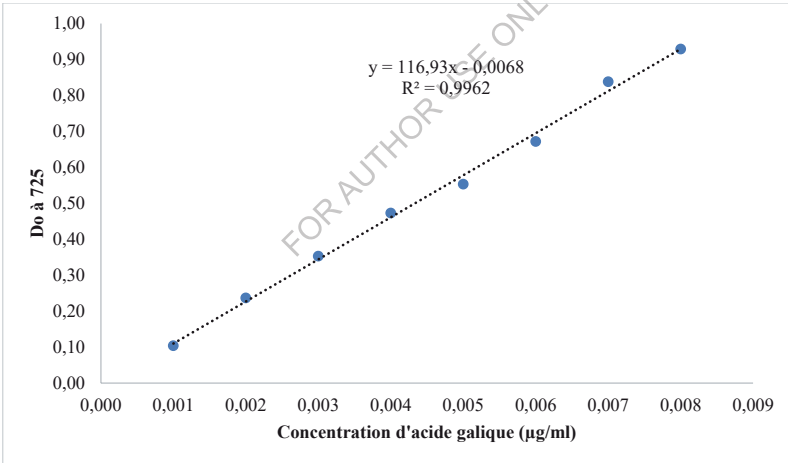
114. **Turroni, F., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2009).** Bifidobacteria : from ecology to genomics. In *Frontiers in Bioscience (United States)*, pp. 4673-4684.
115. **USProbiotic (2006).** Products with probiotics. Usprobiotic.org California Dairy Research Foundation and Dairy & Food Culture Technologies <http://www.usprobiotics.org/products/>.
116. **Vêlez, M.P., De Keersmaecker, S.C.J., and Vanderleyden, J. (2007).** Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters* 276, 140-148.
117. **Ventura, M., O'Flaherty, S., Claesson, M.J., Turroni, F., Klaenhammer, T.R., van Sinderen, D., and O'Toole, P.W. (2009).** Genome-scale analyses of health-promoting bacteria : probionomics. *Nature Review Microbiology* 7, 61-71.
118. **Vesa, T.H., Marteau, P., and Korpela, R. (2000).** Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition* 79, 165S-175S.
119. **Walker, V.K., Palmer, G.R., and Voordouw, G. (2006b).** Freeze-thaw tolerance and clues to the inter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1784-1792.
120. **Welman A.D. et Maddox I.S., 2003.** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria:
121. **Woolford M.K., 1975.** Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of Science Food and Agriculture*, 26, 229-237.
122. **World Gastroenterology Organisation (2008).** Practice guideline : probiotics and prebiotics. WGO Practice Guidelines, 1-23.
123. **Yu X., Hallet S.G., Sheppard J. et Watson A.K., 1997.** Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 301-305.

ANNEXES

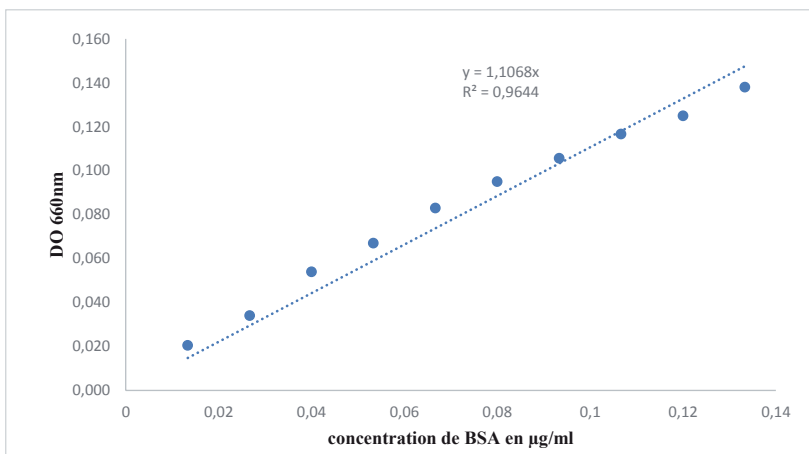
Annexe 1: Courbe d'étalonnage des sucres.



Annexe 2: Courbe d'étalonnage des polyphénols.



Annexe 3: Courbe d'étalonnage des protéines solubles



Annexe 4: Etalonnage et procédure de dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS.

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	E
		S1	S2	S3	S4	S5	
Standard glucose (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	
Solution à doser (ml)	/	/	/	/	/	/	0,25
Eau distillé (ml)	1,25	1	1	1	1	1	1
DNS (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Incuber les tubes dans un bain marie bouillant pendant 5 min, refroidir immédiatement dans l'eau glacée

Eau distillée (mL)	4	4	4	4	4	4	4
DO à 540 nm							

Annexe 5: Etalonnage et procédure de dosage des protéines solubles par la méthode de Lowry

N° Tubes	Blanc	1	2	3	4	5	E
BSA 5 g/l (mL)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	-
Quantité de BSA (μg)	0	50	100	150	200	250	-
Moût (mL)	-	-	-	-	-	-	1
Eau distillée (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Réactif de Lowry (mL)	5	5	5	5	5	5	5
Agiter et attendre 10 min							
Folin-Ciocalteu (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0,5
Agiter immédiatement et incuber à l'obscurité pendant 30min							
D.O (660 nm)							

FOR AUTHOR USE ONLY

Annexe 6: Plan d'expérience de Box- Behnken à 04 facteurs.

Taux d'ensemencement	Taux	Température (°C)	Temps(h)
----------------------	------	------------------	----------

Bifidobacterium(%)		d'ensemencement Lactobacillus(%)					
codée	réelle	codée	réelle	codée	réelle	codée	réelle
-1	5	-1	0	0	39,5	0	25
1	5	-1	0	0	39,5	0	25
-1	5	1	10	0	39,5	0	25
1	5	1	10	0	39,5	0	25
0	5	0	5	-1	37	-1	2
0	5	0	5	1	42	-1	2
0	5	0	5	-1	37	1	48
0	5	0	5	1	42	1	48
-1	5	0	5	0	39,5	-1	2
1	5	0	5	0	39,5	-1	2
-1	5	0	5	0	39,5	1	48
1	5	0	5	0	39,5	1	48
0	5	-1	0	-1	37	0	25
0	5	1	10	-1	37	0	25
0	5	-1	0	1	42	0	25
0	5	1	10	1	42	0	25
-1	5	0	5	-1	37	0	25
1	5	0	5	-1	37	0	25
-1	5	0	5	1	42	0	25
1	5	0	5	1	42	0	25
0	5	-1	0	0	39,5	-1	2
0	5	1	10	0	39,5	-1	2
0	5	-1	0	0	39,5	1	48
0	5	1	10	0	39,5	1	48
0	5	0	5	0	39,5	0	25
0	5	0	5	0	39,5	0	25
0	5	0	5	0	39,5	0	25

Annexe 7:Fiche d'analyse sensorielle de la boisson probiotique

Nom du Panéliste: Date: Sexe: Age: Région:

Veillez examiner et goûter chaque échantillon de pain dans l'ordre tel qu'indiqué sur le bulletin. Indiquez à chaque fois votre degré d'appréciation pour la saveur, l'acidité, le goût et l'appréciation globale de la boisson.

1-) Saveur:

Code de l'échantillon	A	B
9. Extrêmement agréable		
8. Très agréable		
7. Agréable		
6. Un peu agréable		
5. Ni agréable, ni désagréable		
4. Un peu désagréable		
3. Désagréable		
2. Très désagréable		
1. Extrêmement désagréable		

- quel échantillon avez-vous préféré ?
- Pourquoi ?.....
- quel échantillon avez-vous le moins aimé?
- Pourquoi ?.....
- Autres commentaires :

2-) Acidité:

Code de l'échantillon	A	B
9. Extrêmement acide		
8. Très acide		
7. Acide		
6. Légèrement acide		
5. Très peu acide		
4. Pas du tout acide		

- quel échantillon avez-vous préféré ?
- Pourquoi ?.....
- quel échantillon avez-vous le moins aimé?
- Pourquoi ?.....
- Autres commentaires :

3-) Goût:

Code de l'échantillon	A	B
9. Extrêmement agréable		
8. Très agréable		
7. Agréable		
6. Un peu agréable		
5. Ni agréable, ni désagréable		
4. Un peu désagréable		
3. Désagréable		
2. Très désagréable		
1. Extrêmement désagréable		

➤ quel échantillon avez-vous préféré ?

Pourquoi ?.....

➤ quel échantillon avez-vous le moins aimé?

Pourquoi ?.....

Autres commentaires :

.....

4-) acceptabilité générale:

Code de l'échantillon	A	B
9. Extrêmement agréable		
8. Très agréable		
7. Agréable		
6. Un peu agréable		
5. Ni agréable, ni désagréable		
4. Un peu désagréable		
3. Désagréable		
2. Très désagréable		
1. Extrêmement désagréable		

FOR AUTHOR USE ONLY

**More
Books!** 



yes

Oui, je veux morebooks!

I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at

www.get-morebooks.com

Achetez vos livres en ligne, vite et bien, sur l'une des librairies en ligne les plus performantes au monde!

En protégeant nos ressources et notre environnement grâce à l'impression à la demande.

La librairie en ligne pour acheter plus vite

www.morebooks.fr

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY